

6  
201



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFEECTO DE LA MICOTOXINA FUMONISINA B1 SOBRE  
LA INTEGRIDAD DEL ADN GENOMICO DE EJES  
EMBRIONARIOS DE MAIZ (*Zea mays* L.)  
DURANTE LA GERMINACION**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A:  
**FELIPE ALCANTARA SANCHEZ**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

DR. MARINA GAVILANES RUIZ

M. EN C. MARGARITA VILLEGAS RIOS

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR  
1998

269001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Baule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la integridad del ADN genómico  
de ejes embrionarios de maíz (*Zea mays* L.) durante la germinación.

realizado por Felipe Alcántara Sánchez

con número de cuenta 9455663-6 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Propietario Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Propietario M. en C. Margarita Villegas Ríos

Suplente Biol. José Luis Busto Sánchez

Suplente M. en C. José Luis Villarruel Ordaz

*F. Plasencia*

*M. Gavilanes*

*M. Villegas*

*J. Busto*

*J. Villarruel*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Dra. Edna María Suárez Díaz

Consejo Departamental de Biología

*Edna M. Suárez D.*



DEPARTAMENTO

Dedico este trabajo a mi tatarabuela materna.  
A quien nunca conocí, pero le debo mi ADN mitocondrial.

Por cierto... también te lo dedico

(si buscas agradecimientos, temo que no los hallarás aquí, pues la lista era demasiado grande).

## I. Resumen.

La fumonisina B1 (FB1), pertenece a un grupo de micotoxinas producidas por el hongo *Fusarium moniliforme* y especies relacionadas. *F. moniliforme* infecta varias plantas de interés comercial como maíz, trigo y sorgo entre otras. La infección puede ocurrir en tallo, raíces, espigas, o mazorca. El consumo de productos contaminados con FB1 puede causar enfermedades en animales, incluido el hombre. La FB1 también tiene propiedades fitotóxicas que se han estudiado en varios tejidos y callos derivados de plantas, tanto en mono como dicotiledóneas.

La FB1 es muy similar estructuralmente a las bases esfingoides (esfingosina y esfinganina) y con base en esta semejanza, se ha propuesto que es un inhibidor competitivo de la esfingosina (esfinganina) N-aciltransferasa (ceramida sintasa), la cual cataliza unos de los pasos de síntesis de esfingolípidos. Los esfingolípidos cumplen funciones estructurales y en vías de señalización relacionadas con proliferación.

Este trabajo se centra en los efectos que tiene la FB1 sobre la integridad del ADN y la caracterización general de las nucleasas que participan en su degradación en presencia de la micotoxina (requerimientos iónicos y tiempo y concentraciones de incubación). La FB1 induce la degradación del ADN a todas las concentraciones probadas (1  $\mu\text{M}$  hasta 20  $\mu\text{M}$ ), con una degradación máxima cuando la concentración es 10  $\mu\text{M}$ . La degradación del ADN en presencia de FB1 es dependiente del tiempo de incubación, la cual alcanza un máximo entre las 24 y 48 horas de imbibición. También se observó la inducción de tres proteínas con actividad de nucleasa; las condiciones óptimas de actividad se desarrollan en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  a un pH de 7.7.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM con los apoyos de los proyectos DGAPA IN204097 y CONACyT 25131-B.

## II. Índice

I. Resumen.	iii
II. Índice	iv
III. Tabla de abreviaturas	vii
IV. Introducción	1
A. Problemas agrícolas debidos a patógenos	1
A1. <i>Fusarium moniliforme</i> , un patógeno de maíz	1
B. La micotoxicología	2
B1. Ejemplos de micotoxinas	3
B2. Descubrimiento de la fumonisina B1	4
B3. Características de la fumonisina B1	5
C. Incidencia de <i>F. moniliforme</i> y las fumonisinas: situación a nivel mundial y nacional	6
C1. Acciones contra la infección por <i>F. moniliforme</i> y tratamiento de la toxina	8
D. Efectos fisiológicos, celulares y subcelulares de la FB1	9
D1. Efectos en animales	9
D2. Efectos en plantas	11
E. Mecanismo de acción de la fumonisina B1	12
E1. Síntesis y función de los esfingolípidos	13
E2. El mecanismo de acción de la FB1 como objeto de estudio	15
III. Objetivos	18
IV. Hipótesis	18
V. Materiales y método	19
A. Método (diagrama de flujo)	19
B. Material biológico	20
B1. Desinfección de ejes embrionarios de maíz	20
B2. Incubación de ejes embrionarios de maíz	20
B3. Obtención de regiones meristemáticas	21
C. Análisis de ácidos nucleicos	21

C1. Extracción de ADN genómico de ejes embrionarios de maiz	21
C2. Electroforesis horizontal y visualización en gel de agarosa	22
C3. Transferencia del ADN a membrana	22
C4. Southern blot	24
C5. a. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	24
de bajo punto de fusión.	
5b. Marcaje de la sonda	25
(1) Método radioactivo de marcaje	25
(2) Método no radioactivo de marcaje	26
C6. Prehibridación e hibridación de la sonda marcada	27
C7. Autorradiografía	27
C8. Revelado de la placa autorradiográfica	28
C9. Detección por quimioluminiscencia de ácidos nucleicos	29
a. Incubación y bloqueo del anticuerpo	29
b. Incubación con el sustrato quimioluminiscente	29
C10. Exposición a la película	29
C11. Revelado	30
D. Análisis de proteínas con actividad de nucleasa	30
D1. Extracción de proteínas	30
D2. Cuantificación de proteínas	30
D3. Análisis de proteínas	31
a. Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida	32
b. Renaturalización de proteínas	33
c. Incubación para desarrollo de actividad de nucleasa	33
D4. Revelado de la actividad por tinción del ADN	33
a. Tinción con bromuro de etidio	34
b. Tinción con azul de toluidina	34
c. Tinción con reactivo de plata	34
D5. Secado de geles	35
Apéndice: Controles de actividad	36
VI. Resultados	37

A. La fumonisina B1 induce la degradación del ADN genómico	37
B. La fumonisina B1 induce actividades de nucleasa	39
C. Requerimientos iónicos de las actividades de nucleasa	41
D. Existen cuatro bandas de actividad de nucleasa con diferentes requerimientos catiónicos	41
E. Las nucleasas tienen un pH óptimo de 7.7 para desarrollar su actividad	44
F. Las nucleasas caracterizadas tienen pesos diferentes	45
G. La fumonisina B1 también induce la activación de ribonucleasas	46
VII. Discusión	48
A. Discusión de resultados	48
1. Papel de la fumonisina B1 en la virulencia de <i>Fusarium moniliforme</i>	48
2. La respuesta de hipersensibilidad y su relación con apoptosis	49
3. Nucleasas y su función dentro de las interacciones planta - patógeno	52
B. Consideraciones metodológicas	56
VIII. Conclusiones	59
IX. Anexo. Soluciones usadas	60
A. Imbibición	60
B. Extracción de ADN genómico y electroforesis	60
C. Transferencia de ácidos nucleicos	61
D. Prehibridación e hibridación	62
E. Marcaje de la sonda RNAR	62
F. Detección por quimioluminiscencia de ácidos nucleicos	63
G. Extracción y cuantificación de proteínas	63
H. Electroforesis	64
I. Renaturalización	66
J. Actividad de nucleasa	67
K. Tinción del ADN	67
X. Bibliografía	69



### III. Tabla de abreviaturas

$\mu\text{g/g}$	microgramo por gramo (concentración)
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar (concentración)
<b>AAL</b>	toxina de <i>Alternaria alternata</i>
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>AMPc</b>	adenosín monofosfato cíclico
<b>APS</b>	persulfato de amonio
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>BSA</b>	albúmina sérica bovina
<b>cDNA</b>	cadena complementaria de ADN
<b>cm</b>	centímetro
<b>dCTP</b>	desoxicitidín trifosfato
<b>DNA pol I</b>	ADN polimerasa I de <i>Escherichia coli</i>
<b>DNasa I</b>	desoxirribonucleasa I de páncreas bovino
<b>EDTA</b>	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ; sal disódica del ácido (etilendinitrilo) - tetraacético; edetato disódico
<b>FB1</b>	fumonisina B1
<b>h</b>	horas
<b>HR</b>	respuesta de hipersensibilidad
<b>kDa</b>	kilodalton (masa molecular relativa)
<b>LEME</b>	leucoencefalomalacia equina; degeneración leucoencefálica
<b>M</b>	molar (concentración)
<b>mA</b>	miliampere
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mV</b>	milivolt
<b>ng</b>	nanogramo
$^{\circ}\text{C}$	grado celsius
<b>palmitoil-CoA</b>	palmitoil -coenzima A
<b>PCD</b>	muerte celular programada
<b>PKC</b>	cinasa de proteínas C; protein cinasa C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	fosfolipasa A <sub>2</sub>
<b>PP</b>	fosfatasa de proteínas; protein fosfatasa
<b>ppm</b>	partes por millón (concentración)
<b>RE</b>	retículo endoplásmico
<b>RNasa</b>	ribonucleasa A
<b>ROS</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto (velocidad angular)
<b>rRNA</b>	sonda de cDNA que codifica para ARN ribosomal
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>seg</b>	segundos
<b>SSC</b>	solución salina de citrato de sodio
<b>TAE</b>	buffer tris-acetato-EDTA
<b>TE</b>	buffer tris-EDTA
<b>TEMED</b>	trietilenmelamina 2,4,6-tris (1-aziridinil)-s-triazina;

	TEM
<b>UDP-Glucosa</b>	uridin difosforil glucosa
<b>UV</b>	ultravioleta (radiación)
<b>V</b>	volt

## IV. Introducción

### A. Problemas agrícolas debidos a patógenos.

Uno de los problemas del cultivo a gran escala de una sola especie o variedad de planta (monocultivo), es la susceptibilidad generalizada al ataque por distintos patógenos o insectos, que puede alcanzar proporciones epidémicas. Del total de enfermedades en plantas, cerca de un 75 % de ellas son causadas por hongos. Estas enfermedades tienen distintos efectos dependiendo del estado de desarrollo en el cual una planta es infectada y causan pérdidas económicas debidas a: 1) reducción del poder germinativo de la semilla, 2) endurecimiento parcial de granos y semillas; 3) reducción de la viabilidad en las semillas y/o defianoro de embriones; 4) hedor; 5) producción de micotoxinas y 6) pérdida de peso (Agnios, 1988; Deacon, 1993).

De estos problemas, la producción de micotoxinas pone al descubierto un problema que va más allá de las pérdidas agrícolas y sin embargo está relacionada con el manejo agropecuario y las políticas económicas de la región productora. Así pues, la infección de plantas por patógenos, es un problema que se puede ver desde la perspectiva socioeconómica, y además es un fenómeno muy interesante que ofrece información sobre las relaciones entre los distintos organismos. A lo largo de esta introducción se revisarán ambos puntos de vista.

#### A1. *Fusarium moniliforme*, un patógeno de maíz. Revisión histórica.

*Fusarium moniliforme* (anamorfo de *Gibberella fujikuroi*, población de apareamiento A) infecta una gran variedad de plantas de interés económico y es uno de los hongos más comúnmente asociados a maíz (*Zea mays* L.) en sitios productores de este cultivo en todo el mundo. Este hongo se desarrolla sobre los residuos de cultivos o sobre la superficie del suelo. Bajo las condiciones favorables, los hongos infectan tallos de maíz directamente o a través de heridas que dejan insectos o granizo. *F. moniliforme* puede penetrar los tallos en la base de la lámina foliar y avanzar hacia los internodos inferiores. El hongo se encuentra comúnmente en la semilla, pero se cree que esta fuente de inóculo es menos importante que la proveniente de aire o suelo. También pueden estar infectados granos, espigas, raíces

o plántulas (Shurtleff, 1980). La infección de maíz por *F. moniliforme* comparte las características a las causadas por otras especies de *Fusarium* (McGee, 1990; Shurtleff, 1980) y los síntomas de la infección en maíz varían según el tejido infectado:

1) La putrefacción de raíces, infección en la base de la planta e internodos inferiores, comienza poco después de la polinización y se vuelve más severa mientras la planta madura

2) Las lesiones en tallo, que adquiere un color café claro cerca de los nodos y eventualmente la infección causa que el tallo se quiebre.

3) Durante la putrefacción de la mazorca y granos, primero se observa una coloración rosada a café rojiza en los granos (individualmente o en grupos). El crecimiento del hongo se establece comúnmente alrededor de canales que dejan larvas al alimentarse de maíz o de otros organismos que viven en los granos.

La presencia de *F. moniliforme* en alimentos derivados del maíz destinados para consumo humano y animal se ha relacionado con ciertas enfermedades como: degeneración leucoencefática equina (LEME, un mal neurodegenerativo), desarrollo anormal de hueso, intoxicación del ganado (caracterizada por un edema pulmonar severo) y cáncer esofágico humano. Este último tiene una alta incidencia en la provincia sudoccidental de Transkei, en Sudáfrica y en la provincia Henan, en China (Marasas, *et al.*, 1984), pero se desconocía la sustancia causal, a pesar que ya se habían aislado distintos compuestos (Bárceñas-Guevara, 1988).

Rosiles y colaboradores (1996) reportan la presencia de FB1 en alimento de equinos que sufrieron LEME; y posteriormente (Rosiles, *et al.* 1998) un brote de LEME en Oaxaca, México, asociado con alimento contaminado con FB1. Las concentraciones reportadas de FB1 van de 0.67 a 13.3 ppm

## **B. La micotoxicología**

Los efectos tóxicos de alimentos contaminados por hongos han dirigido la atención de muchos investigadores sobre los productos metabólicos de estos organismos, y fue así como se sentaron las bases para fundar una nueva rama en investigación agronómica: la micotoxicología. En esta área confluyen conocimientos que aportan distintas ciencias, que incluyen la micología tradicional, fitopatología, microbiología, química orgánica y analítica, bioquímica, agronomía y climatología. Las

micotoxinas son metabolitos secundarios producidos generalmente por hongos filamentosos y gran parte del conocimiento en esta área se debe al estudio de las aflatoxinas, que son producidas por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Su descubrimiento en la década de los 60s, como agentes causales de cáncer impulsó la investigación en micotoxicología y la búsqueda a otros problemas de infección y contaminación (Lillehoj, 1987).

La mayoría de las especies de hongos toxigénicos encontradas pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Hasta 1984 una de las colecciones más importantes de *Fusarium* contenía 203 cepas toxigénicas, de las cuales 32 son de *F. moniliforme* (Marasas, et al., 1984) Desde el descubrimiento de la fumonisina B1 en 1988, las investigaciones sobre esta micotoxina y sus organismos productores han cobrado gran importancia.

### **B1. Ejemplos de micotoxinas**

En las primeras décadas de este siglo ya se habían aislado varios productos metabólicos de hongos fitopatógenos con efecto tóxico en sus respectivos hospederos u otros organismos. En 1933 apareció el primer reporte de una toxina específica para un hospedero: la de *Alternaria kikuchiana* en la pera japonesa, y en 1947 la de *Helminthosporium victoriae*, en avena (Yoder, 1980). Varios años después, se descubrieron más toxinas con un amplio espectro de acción y cuyos hongos productores carecen de especificidad para un hospedero particular.

Al ser metabolitos secundarios, el papel fisiológico de las micotoxinas no siempre es claro dentro del ciclo de vida del hongo productor. Para algunas especies, este metabolito juega un papel primordial en la patogenicidad de su ataque, es decir, representa un factor importante para que ocurra la infección. Las toxinas producidas por *H. victoriae*, patógeno de avena, y por *H. carbonum* raza 1, patógeno de maíz, han sido descritas como factores de patogenicidad ya que cepas que no producen la toxina son incapaces de infectar a la planta hospedera. En otros organismos la producción del metabolito es importante para determinar la virulencia o agresividad ante el hospedero, como lo que ocurre con las toxinas de *H. maydis* raza T. Pero en general, para muchas micotoxinas su papel en estos fenómenos no es tan claro; por ejemplo, *Periconia circinata*, un parásito de granos de sorgo, necesita de sus toxinas

para infectar, pero también para que su ataque sea virulento, así que no siempre es fácil determinar la función ecológica de la toxina (Yoder, 1980).

En el caso de la fumonisina B1 de *F. moniliforme*, Desjardins y colaboradores (1992 y 1995) aportan evidencia experimental que señala la FB1 como factor de virulencia, ya que las cepas productoras de FB1 causan mayor daño en el hospedero, evaluado por inhibición de elongación del tallo e inhibición de emergencia de la plántula (Desjardins, et al. 1995). Además el análisis genético muestra que existe al menos un gen (*fum 1*) o un grupo de genes ligados que son responsables de la producción de FB1 y sólo las cepas que expresan este gen desarrollan daños más severos en la planta (Desjardins, et al. 1992)

## **B2. Descubrimiento de la fumonisina B1.**

El estudio de las micotoxinas de *F. moniliforme*, reporta varios metabolitos secundarios, algunos fitotóxicos, que incluyen antibióticos, pigmentos quinoides y naftazanna, ácido fusárico, giberelinas, moniliformina y fusarinas (Nelson, 1993) Sin embargo no se pudo demostrar que alguno de ellos fuese responsable de las intoxicaciones que se mencionan antes (Bárceñas-Guevara, 1988; Marasas, et al., 1984). Fue hasta 1988 que un grupo de investigadores sudafricanos aisló una micotoxina utilizando un ensayo de promoción del cáncer (Gelderblom, et al., 1988) y posteriormente se reportó su estructura (Bezuidenhout, et al., 1988). El componente más activo fue llamado fumonisina B1 (FB1) y es un diéster del ácido propano-1, 2, 3-tricarboxílico y un 2-amino-12, 16-dimetil-3, 5, 10, 14, 15-pentahidroxicosano con los grupos hidroxilo de los carbonos 14 y 15 esterificados con el grupo carboxilo terminal de los ácidos (Figura 1). Como se muestra en la Figura 1, la FB1 tiene semejanza estructural con la esfingosina, hecho relacionado con su modo de acción, que se discutirá más adelante (Lynch, 1993; Shier, 1992).

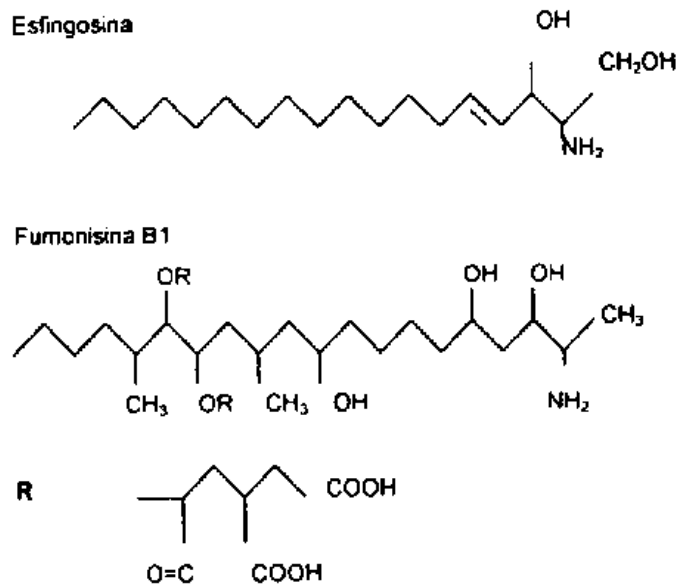


Figura 1. Estructura de la esfingosina y la fumonisina B1.

### B3. Características generales de la fumonisina B1.

La fumonisina B1 es el principal metabolito de una familia de compuestos estructuralmente relacionados. Se han reportado también las fumonisinas A1, A2, B2, B3, B4 y C1, de las cuales, las más tóxicas son la B1, B2 y B3, pues son activas a concentraciones más bajas que las otras además que se presentan en mayores cantidades en muestras contaminadas (Nelson, 1993). Las fumonisinas se han aislado de diferentes cepas de *F. moniliforme* en cantidades muy variables que van de entre 1 y 330 µg/g de cultivo (Ross, et al., 1991). Además de *F. moniliforme* se han aislado fumonisinas de *F. proliferatum* y *F. nygamai* (Thiel, et al., 1991).

La FB1 es una molécula anfipática, soluble en agua y puede ser mantenida en solución acetonitrilo:agua por lo menos durante 6 meses a una temperatura entre -18 y 40°C (Visconti, et al., 1994).

### C. Incidencia de *F. moniliforme* y de las fumonisinas: situación a nivel mundial y nacional.

Con la finalidad de conocer el impacto económico de la infección por *F. moniliforme* a varias plantas de interés agronómico, se han realizado investigaciones con distintos enfoques. De ellas cabe destacar el trabajo publicado en 1996 por Shephard y colaboradores, en el cual se reportan los resultados de una revisión bibliográfica sobre la contaminación de alimentos por fumonisinas, además de material inédito de fuentes internacionales. La finalidad de su reporte es proporcionar una valoración para dar datos confiables sobre la exposición de la población a las fumonisinas al revisar la distribución de fumonisinas en alimentos y forraje alrededor del mundo y los niveles que hay en cultivos, en alimentos humanos disponibles en el mercado y en los cultivos de áreas rurales de consumo propio, así como su existencia en alimentos animales, estén o no implicados en brotes de intoxicaciones animales. Se reporta que los niveles de fumonisinas en forrajes implicados en brotes de LEME son altos, con un máximo de 130  $\mu\text{g/g}$  de FB1 en una muestra de alimento proveniente de Illinois, además de otros datos numéricos. Los autores comentan que con base en el conocimiento sobre los efectos de fumonisinas en animales, los caballos son la especie más sensible, y se ha recomendado que se debe permitir como nivel máximo de fumonisina en el alimento de 5  $\mu\text{g/g}$  para evitar el daño por inducción de LEME. Para cerdos, se ha recomendado un nivel máximo de 10  $\mu\text{g/g}$  para evitar edema pulmonar (EP). En el caso del ganado vacuno y aves de corral se pueden aceptar niveles de hasta 50  $\mu\text{g/g}$  en el alimento. De la comparación de datos de distintos países, el reporte muestra que generalmente se encuentran niveles altos de fumonisinas en productos de maíz de las áreas rurales de Transkei, Sudáfrica (hasta 117.5  $\mu\text{g/g}$ ) y de China (hasta 154.9  $\mu\text{g/g}$ ), EU (hasta 130  $\mu\text{g/g}$  en alimento para ganado) e Italia (hasta 5.31  $\mu\text{g/g}$ ) y en el maíz argentino en pruebas de campo (hasta 6.70  $\mu\text{g/g}$ ). Además la mayor incidencia de pudrición del grano por *Fusarium* ocurre en áreas cálidas y secas. Otro dato en el cual coinciden con otros reportes, es que se encuentran niveles más bajos de fumonisinas en productos de maíz procesados que en aquellos de cultivos agrícolas y alimentos animales: en productos como la tortilla y hojuelas de maíz, los niveles de FB1 están entre 0.01 y 0.16  $\mu\text{g/g}$ , en tanto que



aquellos productos no procesados, como harina y granos, pueden contener hasta 3.73 µg/g.

Otros autores reportan niveles de FB1 en cantidades que van de 0 a 5 mg/g en alimentos a base de maíz, trigo, cebada y sorgo destinados para consumo humano y de animales de granja; pero los niveles más altos se encuentran en maíz (Doko y Visconti, 1994; Visconti, 1996; Visconti y Doko, 1994).

Por otro lado Bullerman (1996) reporta que es posible encontrar fumonisinas B1, B2 y B3 en el grano entero de maíz a niveles de 1.0 µg/g o menores, mientras que los problemas por intoxicaciones en animales suceden cuando las concentraciones están por arriba de 5.0 a 10.0 µg/g, lo cual depende de la sensibilidad del animal a la toxina. En este mismo trabajo establece que entre los productos con niveles más elevados de fumonisinas se encuentran harinas y maíz molido sin procesar.

En México existen pocos estudios sobre la incidencia de fumonisinas en maíz y productos derivados de éste. En un estudio hecho a partir de varias cepas de *F. moniliforme* aislados de maíz de Nuevo León, Desjardins, et al. (1994) encuentra que éstas son capaces de producir entre 10 y 5 480 µg/g de FB1.

Aún antes del descubrimiento de las fumonisinas se había señalado la relación entre los brotes de LEME y alimento contaminado por distintas especies de *Fusarium* por Bárcenas-Guevara (1988), quien concluye que *F. moniliforme*, *F. anthophilum* y *F. subglutinans* se encuentran en alimento contaminado sospechoso de producir LEME, y *F. moniliforme* y *F. subglutinans* están presentes en alimento contaminado procedente de lugares donde se reportaron brotes de edema cerebral equino.

Estos datos advierten sobre el peligro potencial que existe en México por el consumo de alimentos contaminados y la falta de tecnología para la producción y procesamiento del maíz.

Las condiciones ambientales que favorecen la colonización e infección por *F. moniliforme* así como la producción de fumonisinas han sido el objeto de varios estudios. Marin y colaboradores (1995) reportan que las condiciones para la germinación de microconidios son temperaturas altas (hasta 37°C) y humedad relativa baja (o un potencial hídrico muy negativo). Para que el hongo produzca fumonisinas en cantidades altas, es necesario que coincidan altas temperaturas, baja humedad y clima seco durante la polinización o justo antes que ocurra. Además, el equipo de Pascale (1997) hizo un estudio durante 4 temporadas de cosecha de maíz (1992-

1995) utilizando 14 híbridos. Su trabajo consistió en evaluar la acumulación de fumonisinas en los híbridos usados al inocularlos con *F. moniliforme* en condiciones de campo y encontraron que hubo acumulación de fumonisinas en todos los híbridos, aunque el híbrido Mona presentó baja susceptibilidad al daño por *F. moniliforme* y un valor promedio de 1 mg/kg de FB1 en el maíz. Además observaron que hubo influencia considerable en el año de inoculación sobre el grado de infección y acumulación de fumonisinas. De los híbridos que probaron, el Ruten, Smolimag y KLG 2210 tuvieron una baja susceptibilidad a la infección en 1992-1993, pero presentaron un mayor daño y concentraciones de fumonisinas más altas en las temporadas de 1994-1995. Además, los autores sugieren que se puede usar como criterio para valorar la contaminación por fumonisinas en campo, la putrefacción de la mazorca.

Las condiciones para que aparezcan los síntomas, y por tanto la infección, son comunes para muchos hongos y estas son: sequedad al principio de la temporada y temperaturas cálidas (28 a 30°C) 2 o 3 semanas después que comience a madurar el gineceo. Otras condiciones que predisponen a la planta a la infección son: altas concentraciones de nitrógeno y bajas de potasio en el suelo, poblaciones densas y pérdida del área foliar mientras avanza la enfermedad, daño por insectos o granizo, o bien, organismos híbridos susceptibles. Los híbridos de maduración pronta y los ricos en lisina Opaque-2 son más propensos a la infección que los de temporada completa y las plantas tolerantes normales respectivamente (McGee, 1990; Shurtleff, 1980).

#### **C1. Acciones contra la infección por *F. moniliforme* y tratamiento de la toxina.**

Las condiciones climáticas en muchas regiones de América Latina favorecen el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas (Bean y Echandi, 1989), además que las condiciones de almacenamiento de los productos agrícolas no son siempre las ideales para mantenerlos libres de toxinas. El mecanismo más eficiente para prevenir la contaminación de micotoxinas es evitar o reducir la infección por el hongo y para esto la Sociedad Americana de Fitopatología (Shurtleff, 1980) recomienda como medidas de control

- 1) Usar híbridos y variedades resistentes

- 2) manejar fertilizantes en forma balanceada; evitando niveles altos de N y bajos de K
- 3) mantener densidades bajas de plantas

Una vez contaminados los granos es difícil eliminar las micotoxinas y para la FB1 se han probado distintos tratamientos, sin embargo ninguno de ellos ha probado ser satisfactorio para reducir significativamente los niveles de toxina en los alimentos. La amoniacación del maíz, usado para eliminar aflatoxinas, no es útil en el caso de la fumonisinas. El tratamiento térmico requiere temperaturas superiores a 175°C durante 1 h, o bien, si se utilizan temperaturas menores a 150°C se requiere de un pH ácido o básico para lograr la hidrólisis de FB1. El resultado de este tratamiento es un ácido tricarboxílico y un esqueleto aminopentol de 22 carbonos que es casi tan tóxico como la FB1 (Jackson, *et al.*, 1996). El nixtamalizado tradicional, que consiste en un tratamiento térmico con hidróxido de calcio logra reducir niveles de aflatoxinas en un 20%, pero si se aumenta la cantidad de cal se eliminan aflatoxinas y se logra la hidrólisis de fumonisinas, aunque quedan también los mismos productos tóxicos mencionados anteriormente (Voss, *et al.*, 1996).

De manera alternativa, Murphy, *et al.* (1996) proponen un sistema de reacciones entre la FB1 y azúcares reductores como glucosa o fructosa para producir bases de Schiff, cuyos productos no son tóxicos, pero aún faltan las evaluaciones químicas y biológicas para establecer este método.

Voss, *et al.* (1996) estudian el efecto de maíz contaminado con FB1 como alimento para ratas y los resultados de dos métodos tentativos de desintoxicación del material: el nixtamalizado y la extracción acuosa de las fumonisinas. Encontraron que aunque el maíz nixtamalizado resulta menos tóxico que aquél sin procesar, la extracción acuosa es más efectiva para desintoxicar alimento contaminado.

#### **D. Efectos fisiológicos, celulares y subcelulares de la FB1.**

##### **D1. Efectos en animales.**

En animales de granja el consumo de FB1 se ha asociado a varias patologías como la degeneración encefálica de equinos (o LEME, un mal caracterizado por una

necrosis licuefactiva del encéfalo) y edema pulmonar porcino. En conejos, el consumo de alimentos inoculados con 1 ppm de FB1 provoca un incremento en la granulopoyesis, como respuesta probable al estímulo antigénico, así como la destrucción tisular y respuesta inflamatoria de tipo crónica (Mariscal-Quintana, *et al.* 1997).

Estudios hechos con ratas alimentadas con 71 ppm de FB1 (aproximadamente 98  $\mu$ M de FB1) demuestran que ésta causa cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular y nefritis crónica intersticial (Voss, *et al.*, 1996). Datos estadísticos y epidemiológicos apuntan la relación que existe entre los elevados niveles de FB1 en alimentos humanos y cáncer esofágico en África y China (Nelson, 1993; Shephard, *et al.*, 1996).

Uno de los efectos subcelulares de la FB1 es la inhibición de la cinasa de proteínas C (PKC), enzima relacionada con la proliferación celular y estimulación de elementos de respuesta a AMPc en células CV-1 de riñón de mono (Huang, *et al.*, 1995). También se ha encontrado inhibición de fosfatasa de serina/treonina en hepatocitos de rata (Fukuda, *et al.*, 1996) y alteraciones en los niveles de esfingolípidos en células LLC-PK<sub>1</sub> de riñón de cerdo (Yoo, *et al.*, 1996); además de reducir la función de permeabilidad de células endoteliales de arterias pulmonares porcinas (Ramasamy, *et al.*, 1995).

En cultivos de hepatocitos la síntesis *de novo* de esfingolípidos se ve bloqueada y reducen su masa después de 1 día de tratamiento con FB1 a una concentración de 10  $\mu$ M (Wang, *et al.*, 1991). También se reporta en el mismo trabajo que la FB1 no interfiere en los primeros pasos de la síntesis de esfingolípidos, sino en reacciones posteriores, lo cual apunta hacia la reacción catalizada por la esfingosina (esfinganina) *N*-aciltransferasa, que acila tanto esfingosina como esfinganina. Los argumentos se basan en la estructura de la micotoxina y que tal inhibición puede ser debida a la similitud entre la FB1 y la esfingosina. La FB1 carece de un -OH en el C-1, lo cual altera la función de la enzima, posiblemente la orientación del sitio activo, y evade la acilación, o si es acilada el resultado es una ceramida inhibitoria que no puede ser removida del sistema. Todo esto está apoyado en que la relación de esfingosina/esfinganina está alterada en presencia de la FB1: 0.5 comparado con 2.6 en hepatocitos incubados sin toxina.

Con la finalidad de estudiar la carcinogenicidad de la FB1, se estudió su efecto sobre fibroblastos de la línea Swiss 3T3, en los cuales se estimula la síntesis de ADN

de manera proporcional a la concentración de FB1 (Shroeder, *et al.*, 1994) lo cual se debe, probablemente, a la acumulación de bases esfingoides que tienen un efecto mitogénico, o bien a que la FB1 puede estimular directamente la síntesis de ADN al evitar la formación de algún esfingolípido inhibitorio de crecimiento.

Fukuda, *et al.* (1996) analizaron el efecto de la FB1 sobre fosfatasa de proteínas. Ellos encuentran inhibición en esta actividad a concentraciones mayores o iguales a 80  $\mu\text{M}$ . Los autores proponen que éste efecto puede ser una de las causas de la carcinogenicidad ya reportada de la FB1. Entre otros efectos que comentan, mencionan la represión en la expresión de PKC y la inhibición en actividad de fosfatasa de proteínas (PP), y por lo tanto se ven afectadas numerosas vías de transducción de señales.

Sahu, *et al.* (1998) reportan la inducción de la degradación de ADN genómico en núcleos aislados de hígado de rata, atribuida a la peroxidación de lípidos de membrana nuclear.

## **D2. Efectos en plantas.**

A nivel fisiológico se ha propuesto que la FB1 es un importante factor de virulencia para *F. moniliforme* mientras invade la planta. Uno de los efectos evidentes de la toxina en maíz, es la inhibición de elongación radicular en semillas (Doehliert, *et al.*, 1994), lo cual redundaría en el establecimiento de la plántula. Cuando se hicieron estos estudios, no se pudo dar una explicación sobre el mecanismo molecular responsable.

Van Asch, *et al.* (1992) reportan que concentraciones cercanas a 13  $\mu\text{M}$  de FB1 causan una reducción del 50% en el crecimiento de caños de maíz, en tanto que de otras toxinas de *Fusarium* spp. como la moniliformina y toxina T-2 requieren concentraciones de 102  $\mu\text{M}$  y 215  $\mu\text{M}$  respectivamente para lograr los mismos niveles de inhibición. Los autores concluyen que la FB1 podría tener un efecto sobre la división celular, pero no muestran estudios citológicos que lo confirmen.

Abbas y colaboradores (1992) reportan que en hojas de *Datura stramonium* L., la FB1 en concentraciones de 4 a 1400  $\mu\text{M}$  produce autólisis, fotoblanqueamiento de tejidos, pérdida de electrolitos y daño a plasmalema y tonoplasto y además señalan que la luz acelera la reducción de la clorofila. Sus resultados demuestran que la FB1

no inhibe la síntesis de nucleótidos. Posteriormente (Abbas, *et al.*, 1994) reportan que la FB1 inhibe la síntesis de esfingolípidos y provoca la acumulación de bases esfingoides en distintas especies vegetales *Lemna paucicostata* Heglem. 6746, *Lycopersicon esculentum* Mill y *Nicotiana tabacum* cv Wisconsin.

#### E. Mecanismo de acción de la FB1.

Como ya se mencionó, la FB1 podría tener un papel activo en el ataque del hongo al hospedero, pero esta toxina carece de especificidad para un organismo en particular, por lo que es factible suponer que puede actuar a distintos niveles, característica que dependería de concentraciones, tiempo efectivo dentro del sistema o asociación con otras moléculas. En estudios experimentales se ha demostrado que la FB1 es un inhibidor competitivo de la esfingosina (esfinganina) *N*-aciltransferasa (también llamada ceramida sintasa; ver incisos siguientes), y por lo tanto provoca disfunciones en el metabolismo de esfingolípidos (Abbas, *et al.*, 1994; Gilchrist, *et al.*, 1995; Riley, *et al.*, 1996; Schroeder, *et al.*, 1994; Wang, *et al.*, 1991; Wu, *et al.*, 1995; Yoo, *et al.*, 1996), alterando los niveles endógenos de esfingolípidos simples y complejos, pues esta enzima participa en síntesis *de novo* así como en el reciclaje de esfingolípidos membranales. Tales alteraciones conducen a múltiples disfunciones metabólicas relacionadas con el papel de los esfingolípidos.

Además de este modelo de acción se han propuesto otros, que incluyen la inhibición de fosfatasa de proteínas, atribuida a la similitud entre la fumonisina y el ácido okadaico (Fukuda, *et al.*, 1996).

Yin y colaboradores utilizaron un modelo de bicapas de fosfatidilcolina de yema de huevo (1998) y reportan que la FB1 tiene efecto directo en la peroxidación de lípidos de membranas al perturbar las cadenas hidrocarbonadas cerca de la superficie membranal y el aumento de transporte de oxígeno a través de ellas. Encuentran que hay un aumento en fuga de iones pequeños y solutos hidrofílicos. Los autores sugieren que la fumonisina B1 perturba la estructura membranal haciendo más susceptibles a los componentes celulares al daño oxidativo.

## E1. Síntesis y función de los esfingolípidos.

La mayoría de los lípidos acilados comunes de membranas de plantas consisten en una parte no polar diacilglicerol, unida a un grupo polar, como la fosfolina o galactosa; la parte no polar de los esfingolípidos complejos es una ceramida. En tejidos vegetales, la glucosilceramida es el esfingolípido predominante, forma parte de la membrana plasmática y de la del tonoplasto. Los esfingolípidos básicos (o bases esfingodes, como se les tratará en adelante) son aminoalcoholes de 18 carbonos que difieren en sus grupos -OH, por número, posición y configuración estereoquímica, así como en el número y posición de enlaces dobles. Para la síntesis de glucosilceramida y otros esfingolípidos complejos, el primer paso es la síntesis de esfingolípidos de cadena larga a partir de la condensación de L-serina con palmitoil-coenzima A (palmitoil-CoA; Lynch y Farfield, 1993).

La vía biosintética de los esfingolípidos comienza con la síntesis de esfinganina (una base de cadena larga). Posteriormente, se sintetiza la ceramida por acilación de la base de cadena larga. La síntesis de ceramida es un punto común en la formación de los esfingolípidos complejos. Esta síntesis también puede participar, conjuntamente con la hidrólisis de ceramida y la síntesis de esfinganina, en la regulación de niveles de bases de cadena larga libres en las células.

En distintos orgánulos, la síntesis de ceramida requiere condiciones particulares en cuanto a pH, cofactores, sustratos, etc. En mitocondria, por ejemplo, se ha descrito un mecanismo caracterizado por una actividad inversa de ceramidasa que usa ácidos grasos libres como sustrato. Esta actividad se ha detectado *in vitro* cuando hay niveles elevados de ácidos grasos libres y de bases de cadena larga presentes en el medio, pero al parecer esta vía no participa activamente en la síntesis. Mientras, en preparaciones microsómicas y homogenados se ha detallado el mecanismo catalizado por la esfinganina (esfingosina) N-aciltransferasa, que usa acil-coenzima A (acil-CoA) como el donador del grupo acilo. En retículo endoplásmico (RE) se ha reportado un acilación de la base de cadena larga con un ácido graso que es activado por un mecanismo no identificado aún (Lynch, *et al.*, 1993).

La vía dependiente de acil-CoA, puede relacionarse con la síntesis *de novo*, en tanto que la independiente de acil-CoA puede ser para reciclar los ácidos grasos y bases de cadena larga, pues éstos son citotóxicos aún a concentraciones bajas.

El producto típico de la utilización de ceramidas es la glucosilceramida. La actividad de síntesis de glucosilceramida a partir de UDP-Glucosa y ceramida se ha localizado en membranas de aparato de Golgi de animales, mas no de plantas (Lynch, 1993).

Las glucosilceramidas y esfingolípidos relacionados representan cerca de un 5% de los lípidos totales. En plantas son comunes las bases de cadena larga de 18 carbonos aminoalcohol: e incluyen a las bases dihidroxiesfingina (d 18:0), 8-esfingina (d 18:1<sup>8 trans o cis</sup>) y 4,8-esfingadienina (d 18:2<sup>4 trans 8 trans o 4 trans 8 cis</sup>) y las bases trihidroxi 4-hidroxiesfingina (l 18:0) y 4-hidroxi-8-esfingina (l 18:1<sup>8 trans o cis</sup>).

Casi siempre, los ácidos grasos de esfingolípidos de plantas están hidroxilados en la posición 2. Además, las cadenas más abundantes son de 16 a 24 carbonos, saturadas y en algunas plantas se presentan cadenas acídicas de 14 a 24 carbonos. La esfingosina es la base de cadena larga predominante en esfingolípidos animales, mientras en plantas es la 8-esfingina. (Lynch, 1993)

La degradación de ceramida por la ceramidasa presenta la posibilidad de la regulación celular al alterar las concentraciones de bases libres de cadena larga, pues la acumulación de ácidos grasos es un marcador de estrés ambiental o envejecimiento, que puede inhibir la síntesis de esfingolípidos. (Lynch, *et al.*, 1993). En general, las funciones de los esfingolípidos son: aumentar la estabilidad y disminuir la permeabilidad de membranas, como consecuencia de que se puedan formar varios puentes de hidrógeno con otros lípidos y el agua. Los glucoesfingolípidos en particular son importantes en el reconocimiento celular y la transducción de señales. En sistemas animales y fúngicos, la esfingosina participa en regulación de ciclo celular (Lynch, 1993). Como producto de la hidrólisis de la esfingomielina membranar, la ceramida cumple varias funciones en sistemas animales, entre las cuales destacan la de mediador de efectos de agentes extracelulares sobre crecimiento, diferenciación y apoptosis; regula negativamente la fosforilación de proteínas, así como la actividad de cinasas de proteínas, los niveles de *c-myc*, el factor nuclear  $\kappa B$ , la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y la liberación de prostaglandinas (Hannun, *et al.*, 1993; Hannun, 1994).



## **E2. El mecanismo de acción de la FB1 como objeto de estudio.**

Al ser de los primeros inhibidores conocidos de la ceramida sintasa, la FB1 ha sido una herramienta muy útil en el estudio de procesos complejos como el papel de esfingolipidos como mensajeros intracelulares en células animales. En el caso de los sistemas vegetales se puede estudiar la respuesta de la planta a una molécula propia del patógeno que explique la alta susceptibilidad a esta toxina. Esto último se aborda como una forma especial de interacción planta - patógeno.

En la naturaleza existen muchas formas de interacción entre organismos de distinta especie. En el caso especial de la interacción maíz - *Fusarium moniliforme*, las interacciones pueden ser de dos tipos según las condiciones ambientales. Una de ellas es la que se presenta cuando el hongo es saprobio (se alimenta de material vegetal muerto), como parte de un proceso de flujo energético sin que haya organismo perjudicado. La otra forma es la de parasitismo, en la cual el hongo daña a la planta para obtener nutrientes y ocurren una serie de fenómenos que aún no se conocen completamente.

Como ya se mencionó antes, *F. moniliforme* penetra a través de heridas ya hechas en la planta y la producción de FB1 potencia la virulencia del ataque evitando el establecimiento de la plántula.

Se ha reportado que las plantas en caso de ataque por herbívoros o parásitos (patógenos o no), montan una respuesta que implica la expresión de distintos genes y múltiples modificaciones metabólicas (Casacuberta, *et al.*, 1991, 1992; Murillo, *et al.*, 1997). Desde el primer contacto con el patógeno o alguno de los productos secretados por éste hay una serie de señales bioquímicas ente el microorganismo y la planta que determinan el resultado final de la interacción caracterizada por una activación de vías de señales intracelulares que modifican la expresión genética.

Cuando la relación es de tipo parasitaria, el patógeno induce importantes cambios fisiológicos y moleculares por medio de moléculas secretadas llamadas inductores o elicitores, que pueden ser moléculas de superficie del patógeno o restos de su pared celular. La respuesta de hipersensibilidad (HR, por sus siglas en inglés) es un fenotipo característico de las plantas resistentes ante el ataque de un patógeno e implica la muerte celular rápida de las células que se enfrentan al organismo, al parecer con la finalidad de frenar su avance. La aparición de una lesión necrótica en el

lugar del daño está relacionado con una elevación de especies reactivas de oxígeno (ROS) transitoria, la activación de genes específicos de defensa, acumulación de compuestos antimicrobianos (fitoalexinas), alteraciones de la pared celular de la planta y la degradación del ADN genómico (Greenberg, *et al.*, 1994; Mittler, *et al.*, 1997; Wang, *et al.*, 1996). La HR está bajo regulación genética (Greenberg, *et al.*, 1994; Mittler, *et al.*, 1995; Xing, *et al.*, 1996) y debido a sus características, se ha sugerido que ésta es una forma de muerte celular programada parecida a la que ocurre en células animales.

La toxina AAL1, producida por *Alternaria alternata* es un factor de virulencia del hongo en su infección a hojas de *L. esculentum* y se ha demostrado que induce ruptura del ADN y muerte celular con características similares a lo que sucede en células animales (Wang, *et al.*, 1996).

Debido a las diferencias estructurales y fisiológicas entre animales y vegetales y las características morfológicas que definen la apoptosis (una forma típica de muerte celular programada, PCD), se considera como marcador molecular a la degradación del ADN genómico por la activación de nucleasas (Barry, *et al.* 1993; Baxter, *et al.*, 1989; Gaido, *et al.*, 1991; Mittler y Lam, 1995; Peitsch, *et al.*, 1993; Ryerson, *et al.*, 1996; Thelen, *et al.* 1989).

El fenómeno de muerte celular y degradación del ADN genómico ocurre bajo distintas condiciones ambientales y durante el desarrollo de la planta. Así pues, se dice que existen tres tipos de muerte celular: durante el desarrollo normal, por desarrollo perturbado o debida a estrés ambiental; las cuales no utilizan necesariamente el mismo mecanismo celular. Sin embargo, parecen ocurrir por medio de un "desmontaje" controlado de la célula. En contraste, la muerte celular que ocurre a causa de un trauma severo (muerte traumática de la célula o necrosis), como después de la exposición a una concentración alta de toxina, choque térmico o al congelamiento, no es un desmontaje controlado de la célula y se caracteriza por la hinchazón celular y lisis, las cuales no son características morfológicas de muerte celular programada (Buckner, *et al.* 1998).

Aunque las nucleasas son las mediadoras de la degradación apoptótica del ADN genómico, se conoce poco sobre su origen, regulación y características generales. Cuando se hicieron las primeras descripciones de nucleasas, se postularon

como características generales la dependencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  e inhibición por  $\text{Zn}^{2+}$  sin embargo se han demostrado requerimientos iónicos y distintos valores de pH (Mittler y Lam, 1997; Thelen y Northcote, 1989).

## **IV. Objetivos**

### **OBJETIVO GENERAL**

1. Estudiar el efecto que tiene la micotoxina fumonisina B1 sobre la integridad del ADN de maíz durante la germinación.

### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Desarrollar un método rápido y confiable para extraer ADN genómico de tejidos vegetales para evaluar su integridad.

2. Evaluar la integridad del ADN genómico de ejes embrionarios germinando en presencia de fumonisina B1.

3. Desarrollar una técnica electroforética para el estudio de la actividad de nucleasa a partir de extractos proteicos de tejidos vegetales.

4. Caracterizar la actividad de nucleasa presentes en ejes embrionarios de maíz germinando en presencia de fumonisina B1.

5. Relacionar los resultados obtenidos con el papel de la fumonisina B1 como un factor de virulencia de *Fusarium moniliforme*.

## **V. Hipótesis**

Consideramos que la FB1 es capaz de inducir HR y el criterio para caracterizarla es la degradación del ADN genómico mediada por la activación de nucleasas en ejes embrionarios durante su germinación.

## **IV. Objetivos**

### **OBJETIVO GENERAL**

1. Estudiar el efecto que tiene la micotoxina fumonisina B1 sobre la integridad del ADN de maíz durante la germinación.

### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Desarrollar un método rápido y confiable para extraer ADN genómico de tejidos vegetales para evaluar su integridad.

2. Evaluar la integridad del ADN genómico de ejes embrionarios germinando en presencia de fumonisina B1.

3. Desarrollar una técnica electroforética para el estudio de la actividad de nucleasa a partir de extractos proteicos de tejidos vegetales.

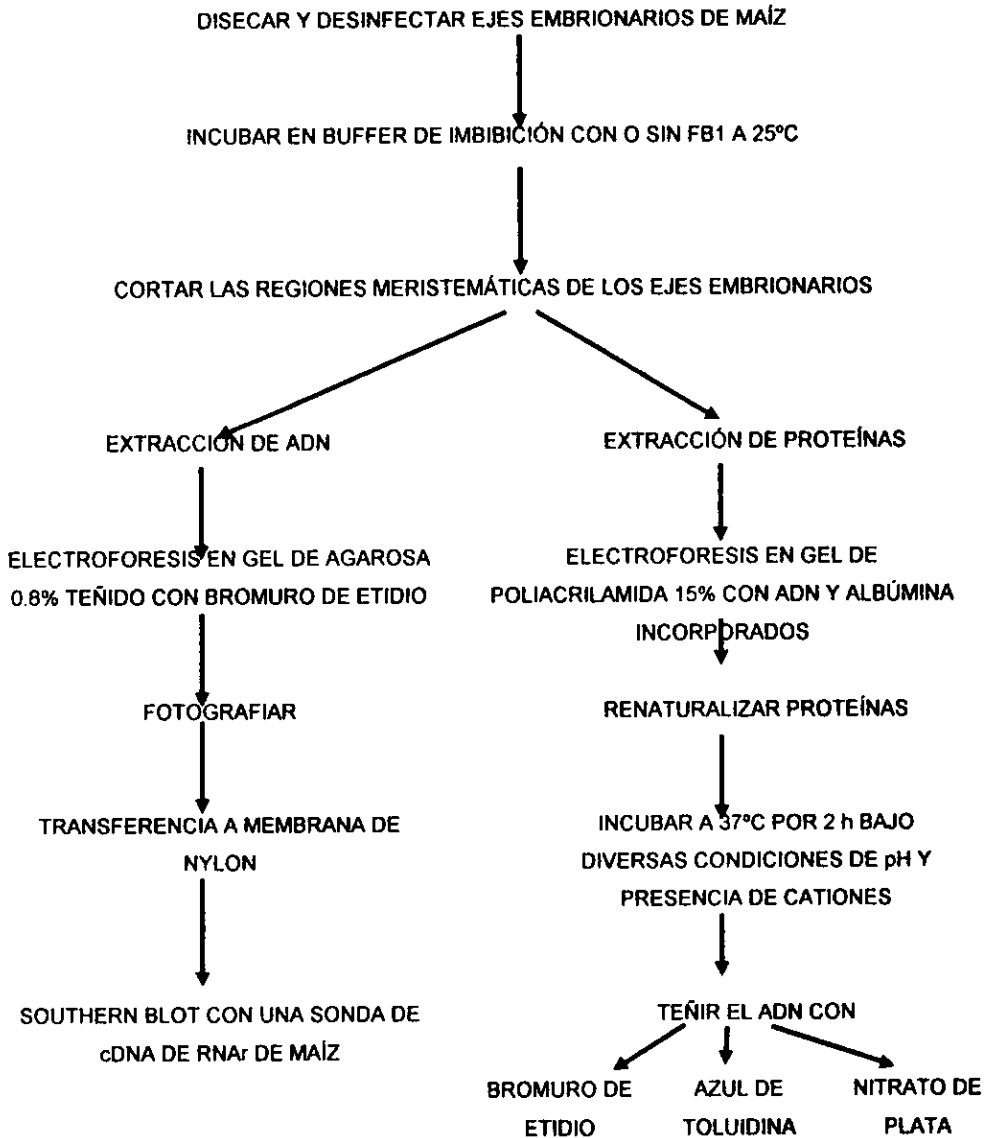
4. Caracterizar la actividad de nucleasa presentes en ejes embrionarios de maíz germinando en presencia de fumonisina B1.

5. Relacionar los resultados obtenidos con el papel de la fumonisina B1 como un factor de virulencia de *Fusarium moniliforme*.

## **V. Hipótesis**

Consideramos que la FB1 es capaz de inducir HR y el criterio para caracterizarla es la degradación del ADN genómico mediada por la activación de nucleasas en ejes embrionarios durante su germinación.

**VI. Materiales y métodos**  
**A. Método (diagrama de flujo)**



**Figura 2.** Diagrama de flujo de los métodos usados.

## **B. Material biológico y métodos**

Con el fin de cumplir con los objetivos de este trabajo, se hicieron dos tipos de experimentos: primero se evaluó el efecto de la dosis de FB1 probando concentraciones de 0, 1, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  en solución de imbibición. El segundo experimento fue la evaluación del efecto a las 6, 16, 18, 22, 24, 37, 41 y 48 h de imbibición empleando FB1 10  $\mu\text{M}$ . Los controles usados fueron extractos de proteínas y ADN provenientes tanto de ejes embrionarios embebidos durante 48 h en buffer de imbibición (Anexo I) sin FB1 y de ejes secos.

Se usaron ejes embrionarios de maíz Chalqueño disecados a partir de granos secos. Estos ejes se desinfectan en cloro comercial diluido 1:10 (vol/vol) en agua estéril dando una concentración aproximada de 0.6 % de hipoclorito de sodio.

### **B1. Desinfección de ejes:**

Por cada caja de Petri de 5 cm de diámetro:

1. Lavar alrededor de 20 ejes en una solución 0.6% de hipoclorito de sodio durante 2 min.
2. Enjuagar con agua estéril 4 veces por 2 min, o hasta que desaparezca el olor a cloro.
3. Distribuir los ejes en cajas de Petri estériles sobre papel filtro estéril.

### **B2. Incubación de los ejes.**

1. Agregar buffer de imbibición 1X (ver Anexo I). Se usa alrededor de 1 mL por caja. A esta solución se le agrega la FB1 a las concentraciones finales indicadas para el experimento.
2. Sellar con papel Parafilm y mantener a 25°C por el tiempo que requiera el experimento.

### **B3. Obtención de regiones meristemáticas.**

1. Transcurrido el tiempo de incubación, tomar los ejes embrionarios y cortar con una navaja estéril ambas regiones meristemáticas (entre 2 y 3 mm aproximadamente de cada uno). Apartar aproximadamente 5 ó 7 pares de meristemas para la extracción de ADN y el resto (13 como mínimo) para la extracción de proteínas.

2. Congelar inmediatamente el tejido en nitrógeno líquido y almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento del análisis.

### **C. Análisis de ácidos nucleicos.**

#### **C1. Extracción de ADN genómico de ejes embrionarios de maíz.**

Este método se basa en el publicado por De la Porta y colaboradores (1983). Se hicieron modificaciones al protocolo original con la finalidad de obtener ADN a partir de pequeñas cantidades de tejido y poder observar su integridad después de los tratamientos con la micotoxina.

1. Moler el material congelado con nitrógeno líquido, en un mortero enfriado previamente en hielo, hasta obtener un polvo fino.

2. Colectar el polvo y transferirlo a un tubo de 1.5 mL estéril, que contiene 1 mL de buffer de extracción (Anexo II) más 1.5  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol. Agregar 60  $\mu\text{L}$  de SDS 20 % e incubar 10 min a  $65^{\circ}\text{C}$ .

3. Agregar 0.4 mL de acetato de potasio 3 M. Mezclar por inversión e incubar en hielo por 30 min.

4. Centrifugar 15 min a 12 000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ .

5. Dividir el sobrenadante en 2 tubos limpios de 1.5 mL que contengan 0.7 mL de isopropanol frío (se recomienda usar puntas de boca ancha al pipetear, pues en este paso se podría fragmentar el ADN). Mezclar suavemente por inversión y dejar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por lo menos 30 min (tiempos más largos son recomendables para aumentar el rendimiento cuando se parte de poco tejido).



6. Colectar el precipitado blanco con una pipeta Pasteur doblada en forma de gancho y transferirlo a un tubo limpio que contenga entre 30 y 100  $\mu\text{L}$  de buffer TE; alternativamente se puede centrifugar 5 min, desechar el sobrenadante y agregarle el buffer TE. El volumen del buffer depende de la cantidad final obtenida de ADN.

7. Disolver el ADN y visualizarlo en gel de agarosa 0.8 %.

## **C2. Electroforesis horizontal y visualización en gel de agarosa.**

1. Agregar agarosa a buffer TAE 1X (Anexo II) a una concentración final de 0.8 % (p/v) y disolverla por calentamiento.

2. Agregar bromuro de etidio a una concentración final de 0.01 mg/mL.

3. Vaciar la agarosa en la cámara de electroforesis horizontal.

4. Mezclar 2 mL de buffer de carga de ADN + 1  $\mu\text{L}$  de RNasa + 8 mL de ADN. Cargar a la agarosa fundida. Otra forma de visualizar el ADN sin interferencia por ARN es agregar RNasa directamente al gel (entre 15 y 30  $\mu\text{L}$ ). (Ver Anexo II).

5. Hacer la electroforesis a un voltaje de 65 - 70 V (en frío o con hielo bajo la cámara para evitar que se caliente), hasta que el azul de bromofenol llegue a la mitad.

6. Observar el ADN usando un transiluminador de luz UV. Fotografiar.

## **C3. Transferencia del ADN a membrana de nylon.**

La transferencia del ADN al soporte sólido se realizó por capilaridad según se describe por Sambrook, *et al.* (1989). Ver anexo III.

Después de correr la electroforesis tratar al gel con:

1. HCl 0.2 N por 10 min. Usar un volumen que cubra al gel. Lavar 3 veces por 2 min con agua desionizada.

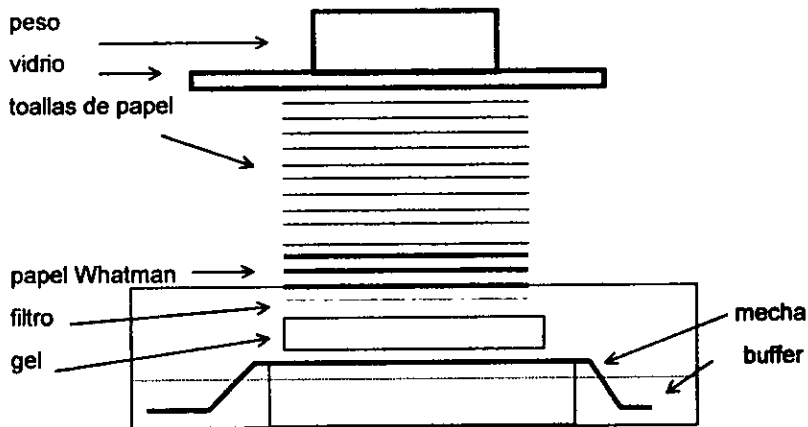
2. Solución desnaturalizante por 10 min dos veces. Para geles grandes por 15 min (los geles usados tienen 5.9 x 7.3 x 0.8 cm).

3. Solución de neutralización 2 veces por 20 min. En geles grandes por 30 min.

4. Cortar el papel de nylon de tal manera que sea 3 mm más pequeño que el gel en ambas dimensiones. Mojar el papel en agua por 1 min y luego en SSC 20X entre 5 y 10 min.

5. Cortar 4 pedazos de papel Whatman 3 MM de tal manera que mida 7 mm menos que el papel de nylon. Cortar una mecha de papel Whatman 3 MM de 20 cm de largo y 2 cm más ancha que el gel.

6. Montar una pirámide como la que se muestra en la figura siguiente:



**Figura 3.** Transferencia por capilaridad de ADN a una membrana de nylon. Se usa el peso para asegurar el contacto entre las capas de papel y el filtro para aumentar la eficiencia. Tomado de Sambrook, *et al.*, 1989.

7. Hacer la transferencia durante 24 h. Usar como buffer de transferencia SSC 20X.

8. Desmontar la pirámide. Enjuagar el filtro por 5 min en SSC 2X para eliminar cualquier residuo de agarosa. Tefir el gel con bromuro de etidio para asegurar que la transferencia fue completa.

9. Dejar secar la membrana sobre papel filtro y después fijar el ADN a la membrana con luz UV.

#### **C4. Southern blot.**

Con la finalidad de probar otra técnica más sensible que permitiera ver un barrido por degradación del ADN genómico, se hicieron hibridaciones de el ADN genómico con una sonda de un cDNA (abreviación en inglés para "cadena complementaria de ADN") que codifica para ARN ribosomales (ARNr) de maíz. Este procedimiento se lleva a cabo en tres pasos principales: (1) purificación de la sonda a partir de un plásmido; (2) marcaje de la sonda con fósforo radioactivo y (3) prehibridación e hibridación. A partir de este momento se llamará a la sonda "RNAr".

#### **C5a. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa de bajo punto de fusión.**

1. Cortar el fragmento de ADN del gel de agarosa al ser visualizado con el transiluminador de luz UV y pasarlo a un tubo de 1.5 mL. Hacer esto rápidamente para prevenir el entrecruzamiento o ruptura del ácido nucleico.
2. Fundir la agarosa a 65 - 70°C por 15 min.
3. Aforar a 0.5 mL con buffer TE. Equilibrar la temperatura con calor.
4. Agregar 0.5 mL de fenol equilibrado pH 7.0 y agitar en vortex por 30 seg. Es importante en este paso usar siempre fenol y no la mezcla de fenol-cloroformo.
5. Centrifugar por 5 min a 12 000 rpm a 4°C.
6. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo limpio, agregar 0.5 mL de fenol y agitar en vortex por 30 seg.
7. Centrifugar 1 min para separar las fases y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
8. Agregar 0.5 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), agitar y centrifugar por 1 min para separar las fases.
9. Transferir la fase acuosa (volumen aproximado de 0.4 mL) a un tubo limpio, agregar 40 µL de acetato de sodio 3 M y 800 µL de etanol absoluto. Mezclar y poner el tubo a -70°C por 30 min.
10. Centrifugar por 15 min, desechar el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70 %. Centrifugar 5 min, decantar el sobrenadante y secar la pastilla junto al mechero. Redisolver en 10 µL de agua desionizada estéril.

## **5b. Marcaje de la sonda.**

Para marcar una sonda, se pueden seguir varios procedimientos. Uno de ellos es hacerlo con algún nucleótido marcado radioactivamente, pero existen métodos no-radioactivos. En este caso se presentan primero el radioactivo y a continuación el no-radioactivo.

### **(1). Método radioactivo de marcaje. "Random primer extension" o Extensión por cebadores al azar.**

1. Agregar 5  $\mu\text{L}$  de agua estéril al tubo que contiene la sonda disuelta en 10  $\mu\text{L}$ .
2. Calentar a 95°C durante 5 min para desnaturalizar la sonda y pasar rápidamente a hielo.
3. Añadir en frío, 5  $\mu\text{L}$  del buffer marcado Random Primer Extension (o Extensión por cebadores al azar, éste contiene los oligonucleótidos que actúan como cebadores o "primers").
4. Agregar 5  $\mu\text{L}$  de los nucleótidos, excepto dCTP.
5. Agregar 2  $\mu\text{L}$  del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*.
6. Agregar 2  $\mu\text{L}$  de [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP. Este es el nucleótido marcado radiactivamente en el fosfato en posición  $\alpha$ .
7. Incubar a 37°C durante 1 h; es importante cubrir con plomo el tubo que contenga esta reacción y seguir todas las recomendaciones del trabajo con isótopos radioactivos.
8. Agregar 150  $\mu\text{L}$  de buffer TE para detener la reacción por dilución y mantener el tubo en el contenedor de plomo.
9. Eliminar de la sonda marcada los nucleótidos no incorporados por cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephadex G-25 y transferir la sonda marcada a un tubo limpio.

## (2). Método no radioactivo de marcaje.

Se siguió el protocolo de DuPont Renaissance ® "Random primer fluorescein labeling" .

1. Descongelar los componentes del marcaje, excepto el fragmento Klenow ("Random primers and reaction buffer" y "Fluorescein nucleotide mix"). El fragmento Klenow debe usarse del congelador para disminuir la exposición a temperaturas mayores a -20°C. Mantenerlos en hielo.

2. Centrifugar los tubos para recuperar todo el volumen a 12 - 14 k rpm por 5 seg.

3. Desnaturalizar el molde (25 ng - 1 µg) antes de marcar. Agregar a un tubo de microfuga el ADN y agua para un volumen final de 19 µL (10 µL de la sonda RNAr + 9 µL de agua). Centrifugar y calentar el tubo a 95°C durante 3 a 5 min y enfriar rápidamente el ADN desnaturalizado en hielo por 5 min.

4. Agregar al tubo:

Random primers and reaction buffer mix	5 µL
Fluorescein nucleotide mix	5 µL
fragmento Klenow de la DNA pol	<u>1 µL</u>
Volumen total	30 µL

5. Centrifugar a 12 000 - 14 000 rpm por 5 seg e incubar la mezcla de reacción por 1 h a 37°C. Para sintetizar mayores cantidades de sonda, incubar toda la noche a temperatura ambiente.

6. Detener la reacción con 5 µL de EDTA 0.1 M pH 8.0. Si no se usa inmediatamente la sonda, puede ser almacenada a -20°C. Si la preparación del molde de ADN fuese pura, la sonda así marcada debe ser estable por lo menos 1 año a -20°C.

### **C6. Prehibridación e hibridación con la sonda marcada.**

Este procedimiento es válido para sondas marcadas tanto de manera radioactiva como las no radioactivas. Ver Anexo IV.

1. Equilibrar a 50 ó 60°C en el horno de hibridación 10 mL de solución de hibridación.

2. Prehibridar durante 1 h las membranas de nylon con la solución de hibridación a 50 - 60°C en el horno de hibridación con rotación. NOTA: las membranas deben tener los ácidos nucleicos hacia la luz del tubo.

3. Desnaturalizar de nuevo la sonda por calor (5 min a 95°C). Agregar la sonda caliente directamente a la solución de hibridación. Es importante mantener el tubo vertical por seguridad.

4. Hibridar a 65°C durante 16 h.

5. Hacer dos lavados de 5 min con 30 mL de solución de lavado a temperatura ambiente en el mismo tubo y con rotación. Después lavar las membranas sobre una charola en la misma solución (cuidar niveles de radioactividad con un contador Geiger).

6. Agitar 5 min a 55°C. En el caso de haber marcado con sonda radioactiva, se sigue una técnica autorradiográfica inmediatamente (descrita más abajo).

### **C7. Autorradiografía**

Colocar las membranas sobre un soporte (puede usarse una hoja de acetato) con los ácidos nucleicos hacia arriba y se cubre con plástico.

En el cuarto oscuro (sólo bajo luz roja especial) colocar las membranas montadas en un cassette para autorradiografía, con los ácidos nucleicos hacia la pantalla amplificadora y encima de ellas la película. Cerrar el cassette y mantenerlo a 70°C durante 48 h, o más si es necesario.

### **C8. Revelado de la placa fotográfica**

Todos estos pasos se hacen en cuarto oscuro bajo luz roja.

1. Se pasa la película del cassette en a la solución reveladora, no más de 5 min. Agitar suavemente.
2. Enjuagar en agua por 30 seg.
3. Pasar a la solución fijadora y agitar hasta que se perciba cambio de color en el fondo de la película.
4. Enjuagar bien el exceso de solución fijadora en agua corriente y colgar para secar la película.

### **C.9. Detección por quimioluminiscencia de ácidos nucleicos.**

Este es un procedimiento alternativo para exponer y revelar membranas con ADN que ha sido hibridado con una sonda no radioactiva. El protocolo está diseñado por DuPont®. Todos los pasos se realizan a temperatura ambiente. Ver Anexo V para las soluciones usadas.

#### **a. Incubación y bloqueo del anticuerpo.**

1. Agitar la membrana en el buffer 1 por 5 min, usando al menos 1 mL de buffer por cada centímetro cuadrado de membrana. Asegurarse que todo el SDS se haya lavado (que ya no haga espuma).
2. Bloquear la membrana en el buffer 2 por 1 h con agitación suave.
3. Dejar la membrana en la solución del anticuerpo conjugado e incubar por 1 h con agitación suave.
4. Lavar vigorosamente la membrana 4 veces por 5 min en el buffer 1.

### **b. Incubación con el sustrato quimioluminiscente**

Para estos pasos se usan los reactivos del kit de Nucleic Acid Chemiluminescence Reagent ® de DuPont®. Ver el Anexo VI para las soluciones usadas.

1. Mezclar volúmenes iguales del reactivo Enhanced Luminol® y el reactivo Oxidante® antes de usar. Usar al menos 0.125 mL de reactivo por centímetro cuadrado de membrana (en este caso aproximadamente 7 mL).

2. Pasar la membrana de la solución de lavado del anticuerpo conjugado final a un contenedor limpio. Agregarle inmediatamente el reactivo quimioluminiscente (NEL 201® o NEL 202® de DuPont®) sobre la membrana.

3. Agitar suavemente por 1 min. Asegurarse que la solución cubra la membrana.

4. Sacar la membrana y quitar el exceso de solución sobre papel filtro.

5. Dejar la membrana húmeda en un protector de propileno sin el separador negro. Se puede usar envoltura plástica en lugar del protector. Asegurarse que no haya humedad por fuera de la envoltura. Exponer lo más pronto posible.

### **C10. Exposición a la película.**

1. Dejar la membrana ya preparada en el cassette con el ADN hacia arriba.

2. Exponer la película por 5 min. y revelar.

3. Repetir la exposición, variando el tiempo de exposición según sea necesario para una sensibilidad óptima. (Para genes monocopia 2 h es un buen lapso; para otros casos se puede dejar toda la noche).



## **C11. Revelado**

Para revelar se sigue el mismo procedimiento descrito antes como Autorradiografía y Revelado de la placa fotográfica.

## **D. Análisis de proteínas con actividad de nucleasa.**

### **D1. Extracción de proteínas.**

De las muestras de ejes embrionarios incubadas a diferentes tiempos y concentraciones de FB1 como se explica anteriormente, se hacen las preparaciones para extraer las proteínas de acuerdo al método descrito por Cruz-García (1997).

1. Congelar y moler entre 10 y 15 meristemos de ejes embrionarios.
2. Disolver en 1 mL de Buffer de extracción de proteínas (Anexo VII).
3. Centrifugar a 60 000 rpm en una ultracentrifuga modelo TL-100 por 30 min a 4°C.
4. Tomar el sobrenadante, repartirlo en alícuotas y congelar a -70°C.

Antes de congelar es posible hacer una cuantificación por espectrofotometría y repartir las alícuotas de un mismo experimento a las mismas concentraciones.

### **D2. Cuantificación de proteínas.**

1. Preparar una solución estándar de albúmina (BSA) 3 mg/mL en buffer de extracción. Diluir el reactivo de Bradford (1:10, v/v) en agua desionizada (anexo parte IX).
2. Hacer una curva patrón preparando las diluciones (por duplicado) de acuerdo a la siguiente tabla:

Cantidad de proteína ( $\mu\text{g}$ )	Volumen del estándar ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de buffer de extracción ( $\mu\text{L}$ )
0	0	10
6	2	8
9	3	7
12	4	6
15	5	5
18	6	4
21	7	3
24	8	2
27	9	1
30	10	0

**Tabla 1.** Soluciones y volúmenes usados para la curva patrón.

3. Agregar 0.99 mL del reactivo de Bradford diluido.
4. Leer densidad óptica a 595 nm. Para calibrar el espectrofotómetro usar el tubo que no contiene proteína (blanco).

### **D3. Análisis de proteínas.**

Para estudiar las posibles proteínas con actividad de nucleasa, se siguió un método zimográfico modificado descrito para plantas (Thelen y Northcote, 1989). El método se basa en la separación electroforética de los extractos de proteínas en un gel de poliacrilamida al 15%, donde se ha incorporado el sustrato (ADN de cadena doble, ADN de cadena sencilla o ARN). También se incluye albúmina en el gel para facilitar la renaturalización de las proteínas y una vez hecho esto, se incuba el gel con distintos cationes divalentes y a diferentes valores de pH para determinar las condiciones óptimas del ensayo. La actividad de nucleasa se revela por tinción del ADN con alguno de los siguientes colorantes: bromuro de etidio, azul de toluidina y reactivo de plata. Ver Anexo VIII.

### a. Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida

1. Preparar las soluciones estándar de poliacrilamida, buffer para el gel separador y buffer para el gel concentrador.
2. Preparar persulfato de amonio (APS) al 10% (p/v) en el momento que se prepare el gel. Este reactivo se puede almacenar hasta 1 semana a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
3. Preparar el gel de acrilamida al 15% incorporando ADN de esperma de salmón a una concentración final de  $300\ \mu\text{g/mL}$  y albúmina (fracción V) a  $50\ \mu\text{g/mL}$ . Agregar al último el APS ( $25\ \mu\text{L}$ ) y el TEMED ( $3.5\ \mu\text{L}$ ).
4. Montar los vidrios y sujetarlos en forma cruzada con las pinzas. Sellar la base de los vidrios con  $0.6\ \text{mL}$  de gel de poliacrilamida para evitar fugas y agregar la poliacrilamida.
5. Una vez polimerizada la poliacrilamida, preparar entre  $1$  y  $2\ \text{mL}$  de gel concentrador y vaciarlo para rellenar el peine y formar los pozos.
6. Preparar el buffer de carga y el buffer de corrida (ver anexo de soluciones).
7. Una vez formados los pozos, sumergido en el buffer de corrida, cargar las muestras.
8. Se procede a correr el gel a  $80 - 110\ \text{mA}$  en frío.

#### NOTAS:

- El Buffer de corrida debe estar frío.
- El volumen de carga de cada pozo depende de la concentración de proteína.
- Previamente al ensayo de actividad se hace un gel de calibración. Las proteínas para este gel se desnaturalizan hirviendo durante  $5\ \text{min}$  en Buffer de carga completo (con 2-mercaptoetanol) y se corren en un gel que no tiene ADN ni albúmina. Para el ensayo de actividad las proteínas no deben hervirse ni tener en el buffer de carga 2-mercaptoetanol, además la albúmina ayuda a su posterior renaturalización.
- Se cargan como controles de actividad de nucleasa DNasa I pancreática (control positivo) e Histona (control negativo),  $1\ \text{ng}$  de cada una (ver Consideraciones metodológicas en el apartado de Discusión).

### **b. Renaturalización de proteínas.**

1. Eliminar el SDS del gel lavando con buffer Tris-isopropanol (Anexo IX) por 15 min en frío dos veces.
2. Lavar con buffer Tris 100 mM por 15 min en frío dos veces.
3. Enjuagar con agua y equilibrar el pH del gel en buffer de incubación durante 30 min en frío.

### **c. Incubación para desarrollo de actividad de nucleasa.**

Para probar las condiciones de actividad óptima de las nucleasas relacionadas con la degradación del ADN, se ensayaron varias soluciones de incubación, que por simplicidad se les llamará Buffer Tris 4mM, Tris-Mg, Tris-Ca, Tris-Mg-Ca, Tris-Mn 0.5, Tris-Mn 2, Tris-Zn 0.5, Tris-Zn 2, Tris-EDTA 0.5, Tris-EDTA 5, Buffer pH 4, Buffer pH 6, Buffer pH 7 y Buffer pH 10 (Anexo X).

1. Enjuagar el gel con agua desionizada.
2. Incubar el gel durante 2 h a 37°C en cada una de las soluciones de incubación mencionadas arriba.
4. Eliminar la solución, enjuagar con agua y tefir.

### **D4. Revelado de actividad por tinción del ADN**

La tinción del ADN incorporado al gel sirve para revelar la actividad de nucleasa que se pretende encontrar. Las técnicas de tinción que se probaron muestran la actividad como espacios "en blanco" donde el colorante o reactivo no se unió al ADN, y esto puede deberse a que hay alguna proteína que enmascara la presencia del ADN, lo cual da como resultado un falso positivo (como es el caso de las histonas en cantidades de microgramos); o por la actividad de nucleasa de la proteína. Se utilizaron tres tinciones diferentes (ver Anexo XI para las soluciones usadas).

### **a. Tinción con bromuro de etidio**

1. Agregar 20  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio (50 mg/mL) al agua (volumen aproximado 20 mL).
2. Agitar durante 5 min. Se puede monitorear la tinción a través del transiluminador de luz UV.
3. Fotografiar el gel teñido.

### **b. Tinción con azul de toluidina.**

Una vez que el gel fue teñido con bromuro de etidio y ha sido fotografiado se le dio el siguiente tratamiento.

1. Enjuagar en agua desionizada sobre una caja Petri de vidrio.
2. Fijar el ADN con solución fijadora y enjuagar con agua.
3. Teñir con azul de toluidina 0.2 %: agregar el colorante directamente al gel y removerlo en cuanto cambie de color (el gel se ve azul, el tiempo que tarda este proceso es de unos 30 segundos).
4. Fijar el colorante por calor 20 seg a la flama del mechero Bunsen.
5. Retirar el exceso de colorante y enjuagar varias veces con agua.
6. Secar el gel.

### **c. Tinción con reactivo de plata.**

Se usó el kit de BioRad ® de tinción de plata para proteínas y ácidos nucleicos, modificado para revelar actividad de nucleasa (Boone, *et al.*, 1997).

1. Agitar el gel en SDS al 5 % para eliminar las proteínas por 2 h (se puede hacer a 42°C para acelerar el proceso).
2. Lavar el gel durante 30 min en metanol al 40 %.
3. Eliminar el metanol y lavar durante 5 min en el reactivo oxidante.
4. Eliminar la solución y lavar en agua desionizada por 15 min como máximo.
5. Eliminar el agua y lavar en el reactivo de plata durante 20 min.
6. Lavar con agua desionizada por 30 seg y eliminar el agua.
7. Lavar el gel en solución reveladora por 30 seg dos veces.

8. Si reaparece el precipitado, desechar la solución y lavar otros 30 seg en solución reveladora.

9. Ya que quede clara la solución, agitar el gel durante 5 min o hasta obtener la intensidad deseada.

10. Eliminar la solución reveladora y lavar el gel con ácido acético al 5 %.

11. Secar el gel.

#### **D5. Secado de geles**

1. Colocar el gel entre dos pedazos de papel celofán húmedo sobre papel filtro húmedo (Whatman 3 MM).

2. Dejar en un secador de vacío por 40 min a 80°C.

### Apéndice: Controles de actividad

Los controles usados para estudiar la actividad de nucleasa fueron la DNasa I como control positivo, la cual ya ha sido bien caracterizada (Adams, *et al.*, 1992) y la Histona H1 como control negativo. Bajo condiciones óptimas de incubación, se puede detectar la actividad de DNasa I aún cuando solamente haya 1 ng de proteína (Fig. 4). Los ensayos presentados en este trabajo se realizaron en las condiciones óptimas encontradas para determinar la actividad de las nucleasas presentes en ejes embrionarios de maíz. La histona en concentraciones altas (mayores a 1  $\mu\text{g}$ ) puede dar señal en el gel, pero como falso positivo, aunque la forma de la mancha de actividad es un poco diferente a la que da una verdadera nucleasa, debido a que su interacción con el ADN lo enmascara, impidiendo la unión del colorante.

DNasa I (ng)				Histona (ng)			
100	10	1	0.1	150	15	1.5	0.15



**Figura 4.** Cantidades mínimas necesarias para observar actividad de nucleasa e interferencia de la histona. Los números representan cantidad de proteína en ng.

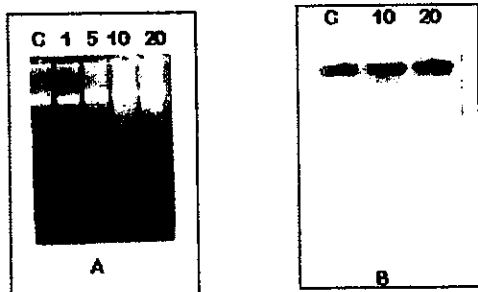
## VII. Resultados

Las técnicas usadas en este trabajo, permitieron observar el efecto de la fumonisina sobre la integridad del ADN genómico de manera cualitativa y semi-cuantitativa. Se estudiaron dos aspectos relacionados con el metabolismo del ADN: la integridad del ADN y la actividad de nucleasa presente en extractos nucleares de proteínas (ver Materiales y métodos). La extracción del ADN se hizo por medio de un método de extracción que no emplea fenol, descrito originalmente por De la Porta *et al.* (1983). El ADN extraído se separó por electroforesis horizontal y se observó tiñendo con bromuro de etidio para posteriormente transferirlo a un soporte sólido para ser analizado por hibridación con sonda de ADN, lo que es más sensible que el método de tinción. Para analizar la actividad de nucleasa se probaron distintos métodos, basados en la separación electroforética de proteínas y desarrollo de actividad sobre ADN incorporado en el mismo gel en el cual fueron separadas. Las técnicas usadas fueron tinción del ADN con bromuro de etidio, plata y azul de toluidina; las dos primeras técnicas son igualmente sensibles, pero la tinción con plata ofrece la ventaja de poder secar el gel teñido de manera permanente. La tinción con azul de toluidina es menos sensible y requiere mayor cantidad de sustrato, pero es más sencilla y barata, además que también permite conservar los geles teñidos de manera permanente.

### A. La fumonisina B1 induce la degradación del ADN genómico.

Después de incubar ejes embrionarios de maíz en presencia de FB1 a distintas concentraciones y durante diferentes intervalos de tiempo, se observó fragmentación del ADN extraído de las regiones meristemáticas de los ejes embrionarios (Fig. 5 y 6). Esta degradación presenta un máximo cuando la concentración de FB1 es de 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 5A y 5B), mientras que a 20  $\mu\text{M}$  la degradación es menor aún después de 72 h de incubación. La integridad del ADN se analizó en ejes embrionarios embebidos en presencia de FB1 (10  $\mu\text{M}$ ) a distintos intervalos de tiempo (Fig. 6). La degradación del ADN se observa a partir de intervalos cortos de exposición (6 h), aunque no es claro que ésta aumente mientras transcurre el tiempo, pues parece que el daño permanece constante al lo largo de la incubación. Se utilizaron cantidades equivalentes de tejido para extraer el ADN.

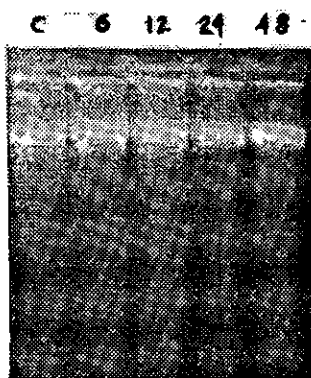




**Figura 5.** Efecto de la dosis de FB1 sobre la integridad del ADN genómico.

**A.** ADN genómico de ejes embrionarios embebidos por 48 h en presencia de FB1. Carril 1, 0  $\mu\text{M}$ ; carril 2, 1  $\mu\text{M}$ ; carril 3, 5  $\mu\text{M}$ ; carril 4, 10  $\mu\text{M}$ ; carril 5, 20  $\mu\text{M}$ .

**B.** Southern blot de ADN de ejes embebidos por 72 h con FB1 0, 10 y 20  $\mu\text{M}$ . La sonda usada es RNAr (ver materiales y métodos).

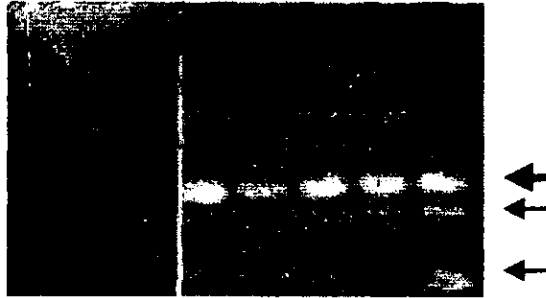


**Figura 6.** Efecto del tiempo de incubación sobre la integridad del ADN genómico. ADN de ejes embebidos durante 48 h sin FB1 (carril 1) y ADN de ejes embrionarios embebidos en presencia de FB1 (10  $\mu\text{M}$ ) durante 6 h (carril 2), 12 h (carril 3), 24 h (carril 4) y 48 h (carril 5).

## B. La fumonisina B1 induce actividades de nucleasa.

Se determinó la actividad de nucleasa en gel a partir de un extracto total de proteínas de ejes embrionarios de maíz tratados con FB1 durante 48 horas a concentraciones de 1, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 7). En los extractos proteicos provenientes de los ejes embrionarios control se observa una actividad de nucleasa (señalado con una flecha gruesa) que más adelante se mostrará se encuentra a lo largo de la germinación. Sin embargo en ejes embrionarios embebidos con FB1 se observan tres actividades más (flechas) aún desde la concentración de 1  $\mu\text{M}$ . La actividad de nucleasas se estudió a lo largo de la germinación en ejes embrionarios embebidos en presencia de FB1 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 8). El carril marcado como C, representa proteínas de ejes embrionarios incubadas 48 h sin FB1. Se usaron como control positivo DNasa I (D) e histona (H) como control negativo. La actividad de nucleasa se revela como regiones donde no hay ADN teñido en el gel y se puede apreciar que aparecen distintas bandas de actividad. Una de estas bandas se encuentra presente en todas las muestras, incluyendo aquéllas sin tratamiento con FB1 (C) y se acumula al transcurrir el tiempo (Fig. 8). Además de estas bandas, aparecen dos más de menor peso molecular inducidas por el tratamiento con FB1 (marcadas con flechas). D, es DNasa I, H, histona y C, proteínas de ejes incubados 48 h sin FB1. Se cargaron 500 ng de proteína total por carril, excepto de DNasa e Histona, cuya cantidad fue de 1 ng (ver Apéndice: Controles de actividad, en la sección de Materiales y métodos). Los geles fueron incubados en Tris-Mg, como se describe en Materiales y métodos y fueron teñidos con azul de Toluidina.

D H C 1 5 10 20



**Figura 7.** Ensayos de actividad de nucleasa de extractos proteicos de ejes embrionarios incubados (ver Materiales y métodos). Los carriles marcados como 1, 5, 10 y 20 son concentraciones de FB1 ( $\mu\text{M}$ ).

D H S C t1 t2 t3 t4 t5 t6



**Figura 8.** Efecto del tiempo de exposición a FB1 ( $10 \mu\text{M}$ ) sobre la actividad de nucleasa durante 16 h (t1), 18 h (t2), 22 h (t3), 37 h (t4), 41 h (t5) y 48 h (t6). El carril marcado como C son proteínas de ejes embrionarios incubados durante 48 h sin FB1; S, son proteínas de ejes embrionarios secos. El gel fue tratado con buffer Tris-Mg-Ca.

### C. Requerimientos iónicos de las actividades de nucleasa.

La caracterización de las actividades de nucleasas inducidas por FB1 se realizó con las proteínas extraídas a las 16, 18, 22 h, 37, 41 y 48 h de imbibición. Se observó que las nucleasas inducidas por FB1 requieren  $Mg^{2+}$  para máxima actividad. La DNasa I, usada como estándar de actividad, no desarrolla actividad nucleolítica sin  $Ca^{2+}$  (Fig. 9).

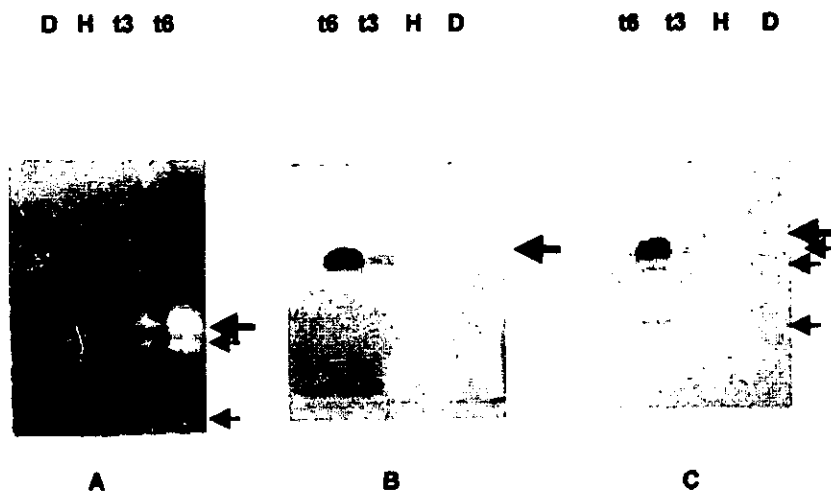


Figura 9. Actividad de nucleasa en presencia de  $Mg^{2+}$ . Las condiciones y proteínas cargadas son las mismas que las descritas anteriormente.

### D. Existen cuatro bandas de actividad de nucleasa con diferentes requerimientos catiónicos.

Las condiciones de ensayo con  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  no permitieron observar todas las actividades de nucleasa inducidas por FB1 y para estudiar los requerimientos catiónicos, se ensayaron diferentes cationes divalentes y combinaciones de ellos (Fig. 10). Se encontraron 4 bandas con distinta migración y diferentes requerimientos catiónicos para su actividad hidrolítica. La de mayor peso molecular (NU70) es activa en presencia de  $Zn^{2+}$  2 mM (Fig. 10G), pero no en presencia de  $Ca^{2+}$  (Fig. 10B),  $Mn^{2+}$  (Fig. 10H y 10I) y EDTA (Fig. 10D y 10E). En orden decreciente de peso molecular, aparece una banda de actividad no inducible por FB1 (NU50) y tiene máxima actividad en presencia de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (Fig. 10B y 10C), pero no es activa en presencia de  $Zn^{2+}$  (Fig. 10F y 10G) ni  $Mn^{2+}$  (Fig. 10E y 10F).

No es inhibida completamente por EDTA (Fig. 10D y 10E). Esta banda aparece como una sola en la mayoría de los ensayos, pero en uno de los geles mostrados más adelante aparece como dos bandas separadas, lo cual se debe a un artificio de la electroforesis. La siguiente banda de actividad (NU43) aparece en presencia de  $Mg^{2+}$  (Fig. 7, 8, 9) pero es inhibida por  $Ca^{2+}$  (Fig. 10B) y EDTA (Fig. 10D y 10E). No la activan  $Zn^{2+}$  (Fig. 10F y 10G) ni  $Mn^{2+}$  (Fig. 10H y 10I). Finalmente la banda de menor peso molecular (NU15) se activa en presencia de  $Mg^{2+}$  (Fig. 7, 8 y 9),  $Zn^{2+}$  2 mM (Fig. 10G) y  $Mn^{2+}$  (Fig. 10H y 10I); pero no es activa en presencia de  $Ca^{2+}$  (Fig. 10B),  $Zn^{2+}$  0.5 mM (Fig. 10F) ni EDTA (Fig. 10E y 10F). Estos datos se presentan en forma resumida en la Tabla 2. La actividad que se observa en el buffer Tris libre de cationes (Fig. 10A) puede deberse a la presencia de cationes en la solución, ya que se pueden eliminar casi por completo con EDTA 0.5 mM. NOTA: Sólo se señalan con flechas los lugares donde se aprecia la banda de actividad.



**Figura 10.** Requerimientos iónicos e inhibidores de las nucleasas caracterizadas. Las proteínas fueron renaturalizadas como se describe en Materiales y Métodos y fueron incubadas para desarrollar actividad en las siguientes soluciones: A, buffer Tris 4 mM; B, Tris-Ca; C, Tris-Mg-Ca; D, Tris-EDTA 0.5; E, Tris-EDTA 5; F, Tris- $Ca^{2+}$  0.5; G, Tris-Zn 2; H, Tris-Mn 0.5; I, Tris-Mn 2.

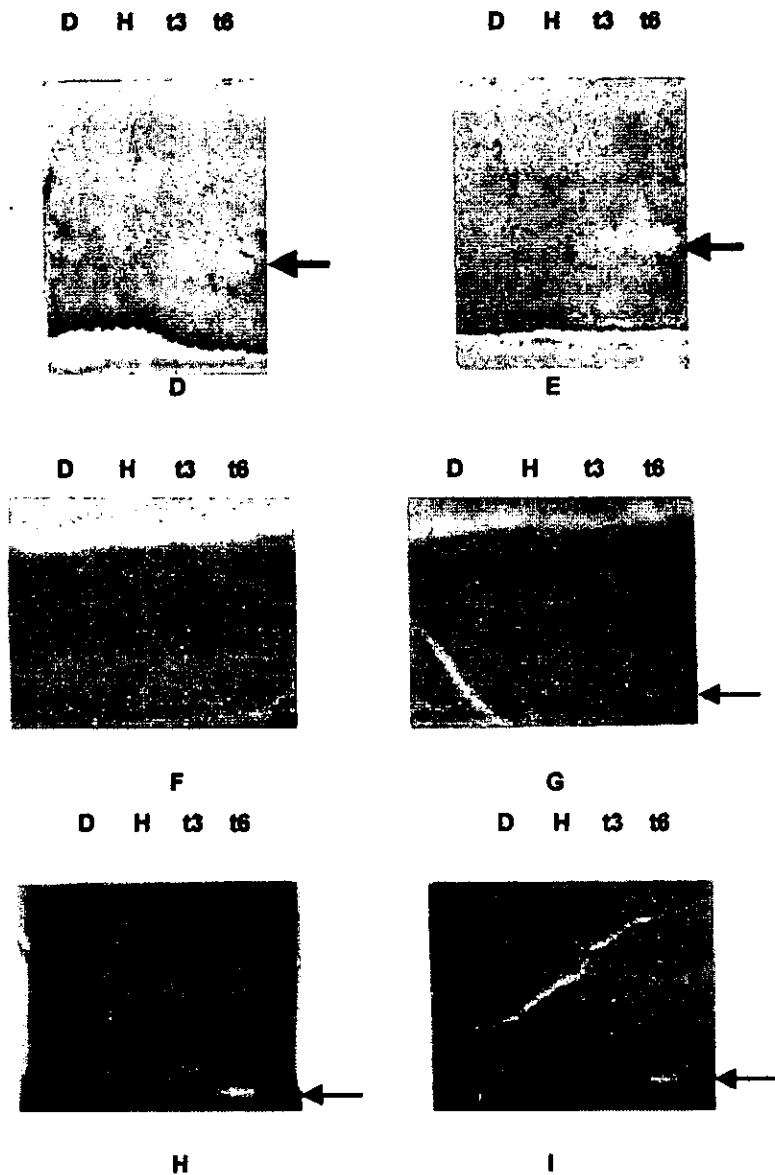
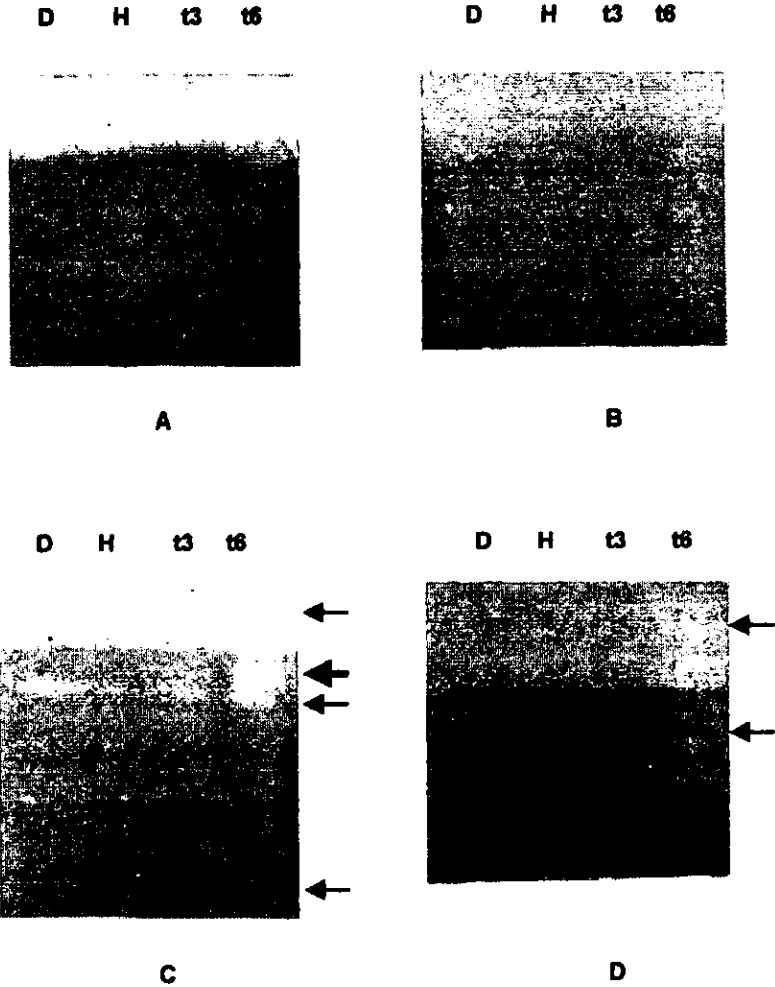


Figura 10. (continuación). Requerimientos iónicos de las actividades de nucleasa.



**Figura 11.** Actividad de nucleasa a distintos valores de pH. Las proteínas fueron incubadas según se describe en Materiales y métodos en las siguientes soluciones: A, buffer pH 4; B, buffer pH 6; C, buffer pH 8 y D, buffer pH 10.

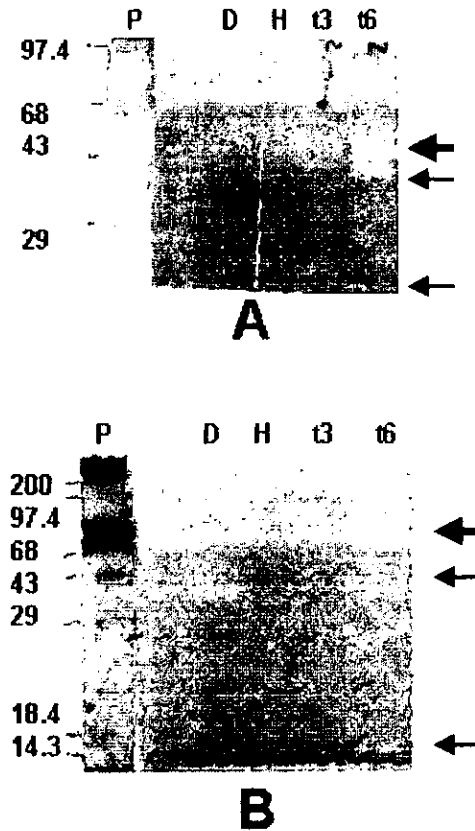
### **E. Las nucleasas tienen un pH óptimo de 7.7 para desarrollar su actividad.**

Con el objetivo de determinar el pH óptimo para las nucleasas encontradas en los experimentos anteriores, se hicieron cuatro ensayos a distintos valores de pH cercanos a 4, 6, 8 y 10 (ver anexo para las soluciones usadas). A pH 4 (Fig. 11A) no se detectó actividad de nucleasa y a pH 6 (Fig. 11B) se observó baja actividad sólo en la banda cuyo peso NU70. A pH ligeramente básico (7.7, Fig. 11C) se pudieron apreciar todas las bandas de actividad en presencia de  $Mg^{2+}$ . La banda de menor peso presenta mayor actividad a pH 7.5 (Fig. 9). A pH cercano a 10 sólo se aprecia actividad en las bandas de mayor y menor peso (Fig. 11D).



**F. Las nucleasas caracterizadas tienen pesos moleculares diferentes.**

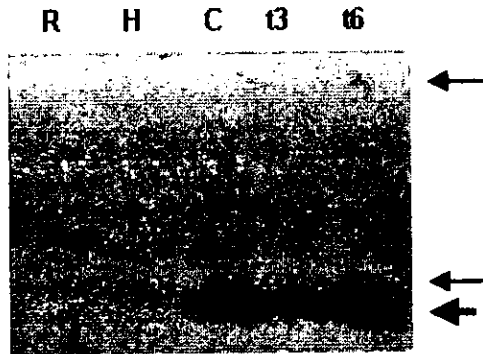
Se hizo una electroforesis de los extractos proteicos y se incubaron en buffer Tris-Mg (Fig. 12A) y Tris-Zn 2 (Fig 12B) para conocer los pesos moleculares aproximados. Se usaron los estándares de peso molecular de Life Tech ®. Se cargaron las muestras marcadas como t3 y t6. en ambos geles.



**Figura 12.** Pesos moleculares estimados de las nucleasas estudiadas. P, es el marcador de peso y las masas relativas (Mr) son 14 300, 18 400, 29 000, 43 000, 68 000, 97 400, 200 000. A es un gel tratado con buffer Tris-Mg, y B fue tratado con Tris-Zn 2.

### G. La fumonisina B1 induce la activación de ribonucleasas.

Para determinar la especificidad de las nucleasas encontradas, se realizaron ensayos de actividad sobre ARN (ver Materiales y métodos y el Anexo de soluciones) en condiciones óptimas (pH 7.7 en presencia de  $Mg^{2+}$ ). Se observa una banda de actividad constitutiva y acumulable de bajo peso molecular, y dos bandas más de baja actividad inducidas (de mayor peso; Fig. 12).



**Figura 13.** Actividad de RNasa en proteínas de ejes embrionarios. El gel fue incubado en buffer pH 8 y tefido con bromuro de etidio (ver Anexo). R, es RNasa A, usada como control positivo (1 ng).

Tabla 2. Descripción de las nucleasas caracterizadas en este trabajo. La concentración de cada catión es 2 mM, excepto donde se indica; para referencias consultar Materiales y métodos.

Nucleasa	Mr aprox*	Cationes que la activan	Cationes que no la activan o la inhiben	pH óptimo	Características
NU70	>70 000	Zn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	7.7, 10.6	inducible por FBI
NU50	50 000	Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	7.7	constitutiva y acumulable
NU43	<43 000	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	7.7	inducible por FBI
DNasa I	31 000	Ca <sup>2+</sup> +Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> 0.5	Zn <sup>2+</sup> 2, Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	7.7, 7.5	control positivo
NU15	15 000	Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> 2, Mn <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> 0.5	7.5, 10.6	inducible por FBI.
R1	>70 000	Mg <sup>2+</sup>	-	7.7	inducible por FBI
R2	<68 000	Mg <sup>2+</sup>	-	7.7	inducible por FBI
R3	<<68 000	Mg <sup>2+</sup>	-	7.7	constitutiva y acumulable

\* Mr es la masa relativa de la proteína.

## VIII. Discusión

### A. Discusión de resultados

#### 1. Papel de la fumonisina B1 en la virulencia de *Fusarium moniliforme*

La función ecológica de una toxina producida por un hongo fitopatógeno, está determinada por el papel que desempeña durante la infección. Se ha demostrado que cepas de *F. moniliforme* productoras de altas cantidades de toxina, provocan mayores daños a la planta durante la infección, y por lo tanto es posible clasificar a la FB1 como un factor de virulencia (Desjardins, *et al.* 1992, 1995). Se han propuesto diferentes modos de acción de la FB1 dentro de distintos sistemas celulares, los cuales se basan en la semejanza estructural que tiene la FB1 con bases esfingoides (esfingosina y esfinganina) y el ácido okadaico. Ambos tipos de moléculas desempeñan funciones importantes como reguladores de actividades enzimáticas involucradas en fenómenos celulares diversos. Posiblemente la alteración del metabolismo de esfingolípidos sea suficiente para desencadenar reacciones que conduzcan a la activación de programas de muerte celular bajo condiciones fisiológicas específicas. También es posible que bajo condiciones diferentes de desarrollo y estado fisiológico, ocurran disfunciones en la regulación de la proliferación y se desarrollen tumores cancerosos. Ambos fenómenos pueden suceder en el mismo organismo, lo cual depende de la dosis, estado alimenticio y células afectadas, entre otras causas.

La FB1 es una toxina que carece de especificidad para un hospedero, y esto posiblemente se deba a que su forma de interacción con sistemas celulares tenga varios blancos distintos que pertenecen a una vía común en muchos sistemas. Los estudios de fitotoxicidad hechos en maíz, demuestran que la FB1 tiene un amplio espectro de acción que depende de las condiciones del sistema. Van Asch y colaboradores (1992) reportan que la FB1 inhibe el crecimiento de callos de maíz en un 50% cuando la concentración es cercana a 13  $\mu\text{M}$ , pero si la toxina es eliminada del medio, los callos son capaces de recuperar el control de su crecimiento; los autores proponen que el mecanismo de acción puede ser sobre la división celular, aunque para probar esta hipótesis, son necesarios estudios citológicos. En estudios sobre el crecimiento de plántulas de maíz en presencia

de fumonisina a distintas concentraciones (de 0 a 100 ppm, que corresponden a concentraciones de 0 a 138.5  $\mu\text{M}$ ), se mantiene el porcentaje de germinación entre semillas control y las tratadas con FB1, pero se inhibe la elongación de la radícula hasta en un 75 % después de 48 h de imbibición (Doehliert, *et al.* 1994).

En un reporte donde prueban concentraciones de FB1 que van de 4 a 1388  $\mu\text{M}$ , observan que hay daños importantes en membranas y síntesis de clorofila en hojas de *Datura stramonium* L. La conductividad del medio aumenta de manera aguda cuando la concentración de FB1 es igual o mayor a 60  $\mu\text{g/mL}$  (aproximadamente 82  $\mu\text{M}$  de FB1). A concentraciones de 500  $\mu\text{g/mL}$  se observa daño en membranas, reducción en la cantidad de clorofila en un 70 % y deterioro a orgánulos. El daño observado es proporcional a la concentración de FB1 y duración de la exposición. Los autores sugieren que a tales concentraciones la membrana plasmática o vacuolar son los principales sitios de acción de la toxina (Abbas, *et al.* 1992).

Además, con la FB1 es posible caracterizar vías de señalización que activan mecanismos de defensa y muerte celular programada. Por ejemplo, se han hecho estudios con la toxina AAL, un análogo estructural de la esfingosina (como las fumonisinas), como inductor de un programa de muerte celular comparado con apoptosis (Wang, *et al.* 1996). Así pues, el manejo de la FB1 ofrece una herramienta que permite estudiar fenómenos de fisiología que van desde la señalización hasta los mecanismos que conducen a la muerte celular.

## **2. Respuesta de hipersensibilidad y su relación con apoptosis**

La hipótesis en la cual se basa originalmente este trabajo, es que la FB1 induce cambios bioquímicos que alteran la expresión genética del hospedero por la activación de una respuesta de hipersensibilidad (HR). Uno de los cambios que posiblemente ocurren, es la activación de nucleasas, como una respuesta al patógeno. En este trabajo se demostró que ocurre la activación de distintos tipos de nucleasas y su efecto sobre la integridad del ADN.

La HR ha sido comparada con la muerte celular programada (PCD) descrita en células animales (Greenberg, *et al.* 1994; Mittler, *et al.* 1995; Ryerson, *et al.* 1996; Wang,

*et al.* 1996), la cual ocurre durante el desarrollo e infecciones. Para poder comparar el tipo de muerte celular que se observe, es necesario recurrir a un marcador molecular: la degradación del ADN genómico.

La degradación del ADN genómico es un fenómeno normal durante el desarrollo del maíz. Actualmente se han descrito procesos de degradación y muerte celular en distintos tipos celulares de eucariotos superiores durante su desarrollo y otros tipos de sucesos en los cuales intervienen múltiples sistemas de comunicación. Durante la germinación del maíz existe un balance entre las tasas de síntesis y degradación del ADN genómico, reflejado por actividades enzimáticas. Este cociente es distinto para cada variedad de maíz y su valor está relacionado con el rápido establecimiento de la plántula (Mino, *et al.* 1987). Los autores describen este fenómeno durante la germinación de un híbrido heterótico de maíz comparado con sus líneas parentales y sugieren que la diferencia cuantitativa y cualitativa en la degradación del ADN y (o) la síntesis *de novo* de ADN entre un híbrido F<sub>1</sub> y líneas parentales se relaciona con un mayor contenido de ADN en las células embrionarias y la expresión del llamado vigor heterótico (Mino, *et al.* 1987).

Este trabajo pone en evidencia que uno de los efectos deletéreos de la FB1 es inducir la degradación de ácidos nucleicos y posiblemente a través de la activación de varias nucleasas. Sin embargo existen otras posibilidades para explicar este fenómeno: una de ellas es la interacción directa de la FB1 con el ADN; otra posibilidad es el efecto indirecto que provoca la presencia de la toxina dentro del sistema, activando señales específicas que promuevan una serie de alteraciones bioquímicas y fisiológicas. La primera opción no ha sido bien documentada, y requiere una serie de técnicas diferentes al enfoque original de este trabajo. La segunda opción implica necesariamente que la FB1, por sus características bioquímicas, provoque cambios fisicoquímicos importantes; como de pH, estado redox y estabilidad de algunas moléculas. Recientemente Sahu y colaboradores (1998) proponen un modelo diferente de acción para la FB1 considerando su semejanza con lípidos de membrana. Estos autores demuestran que, en núcleos aislados de hepatocitos de rata, la FB1 provoca un aumento en radicales hidroxilo los cuales pueden ser los iniciadores de la peroxidación de lípidos de membranas nucleares. Los radicales peroxilo ahora presentes, pueden ser responsables del rompimiento de cadenas de ADN. De manera alternativa, proponen que los radicales hidroxilo favorecen

la unión de iones metálicos al ADN, lo cual puede provocar cortes dirigidos y además son, de alguna manera, insensibles a la remoción como especies reactivas de oxígeno.

Otro posible modo de acción, que cuenta con mucho apoyo experimental se basa en el parecido estructural que tiene la FB1 con bases esfingoides y las funciones de estas últimas dentro de vías de señalización celular. Se ha documentado en varios trabajos el papel inhibitorio de la FB1 sobre la ceramida sintasa provocando una alteración del metabolismo de esfingolípidos, lo cual afecta la regulación presente de señales de crecimiento y desarrollo en sistemas vegetales y animales (Gilchrist, *et al.* 1995; Hannun, *et al.*; 1993; Hannun, 1994). Esta alteración en niveles de esfingolípidos, conduce a disfunciones a distintos niveles, dado que tanto la ceramida como sus precursores mantienen estrecha relación con distintas proteínas y por lo tanto afectan múltiples vías (Fukuda, *et al.* 1996; Oishi, *et al.* 1990).

En este trabajo se reportan los efectos que tiene la FB1 sobre la integridad del ADN genómico de maíz, posiblemente mediante la activación de nucleasas. La FB1 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  presentó un efecto máximo observado por la degradación del ADN genómico de regiones meristemáticas desde las primeras 12 h de imbibición. Estos datos proporcionan evidencias que podrían explicar la inhibición del crecimiento de plántulas de maíz reportado por Doehlert, *et al.* (1994) a nivel molecular y permite apreciar el papel de la FB1 como factor de virulencia, pues pequeñas dosis de FB1 son suficientes para inducir actividades de nucleasa y se vea alterado el metabolismo del ADN en maíz, lo cual tiene efecto directo en la capacidad de establecimiento como plántula.

Durante el ataque por patógenos, es común observar la degradación del ADN, pero no se ha determinado con claridad su función. Mittler y Lam (1997) argumentan que la degradación del ADN genómico en plantas por HR, pertenece a uno de los mecanismos generales que ocurren por invasión de un patógeno, pues así se evita la incorporación de partículas virales al genoma, además que ocurre de manera simultánea con otros procesos típicos de HR.

Schoitens-Toma y colaboradores (1991) señalan que los patógenos necrotróficos producen toxinas para matar las células del hospedero antes que se induzca una

reacción de defensa. La HR proporciona un mecanismo de defensa, que paradójicamente induce el suicidio de la primer célula infectada, así como células adyacentes con el resultado de detener el avance del patógeno. Sobre esto, Aist y Bushnell (1991) proponen que la HR puede cumplir uno o más objetivos relacionados con la defensa, como son: 1) limitar la disponibilidad de nutrientes que lleguen al hongo por los haustorios; 2) producir daño físico a los apresorios o hifas mientras los cuellos haustoriales fijos degeneran; 3) liberar factores tóxicos de las células moribundas (posiblemente compuestos autofluorescentes) o 4) inducir la producción de fitoalexinas, que son compuestos tóxicos para el patógeno. Además, como se mencionó en la introducción, Buckner, *et al.* (1998) hacen una comparación entre los tipos de muerte celular y señalan una característica importante que distingue a la muerte celular por necrosis de la que ocurre durante el desarrollo o por activación de HR: el seguimiento de un programa genéticamente establecido. La HR está sometida a regulación genética y una característica que ayuda a distinguirla es la producción de distintas proteínas típicas de resistencia. Datos preliminares en nuestro laboratorio indican que la FB1 induce una fuerte expresión de uno de los genes de respuesta característicos de HR. Se trata de un gen de la glicoproteína rica en hidroxiprolina (HRGP) expresado a un nivel máximo a las 12 h de imbibición en ejes embrionarios de maíz con FB1.

### **3. Nucleasas y su función dentro de las interacciones planta - patógeno**

Se han reportado una amplia diversidad de nucleasas, con actividades de exo- y endonucleasas, cuyas masas relativas (*Mr*) van de 12 000 a 135 000 para las endonucleasas y de 28 000 a 140 000 para las exonucleasas, además de tener distintas afinidades catiónicas, así como valores óptimos de pH y especificidad por ácidos nucleicos de una o doble cadena. Los cationes más usuales para estabilizar la estructura o como activadores de las nucleasas son  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . Las nucleasas con afinidad por el  $\text{Zn}^{2+}$  son más afines a ADN o ARN de cadena sencilla e hidrolizan generalmente a pH ácido. Las RNasas también son muy variadas en cuanto a tamaño, condiciones de reacción (pH y cofactores) así como estabilidad, lo cual se relaciona con funciones específicas; la mayoría de éstas son degradativas y otras de procesamiento (Adams, *et al.* 1992).



Sin embargo son escasos los reportes sobre las nucleasas que participan en la PCD. Los reportes que se pueden encontrar describen someramente los requerimientos iónicos de algunas nucleasas de células de mamífero que participan en apoptosis (Barry, *et al.* 1993; Baxter, *et al.* 1989; Gaido, *et al.* 1991; Peitsch, *et al.* 1993).

Barry, *et al.* (1993) reportan que una endonucleasa ácida con un peso cercano a 29 kDa purificada de ovario de hámster chino (CHO), degrada ADN de cadena doble o sencilla, a un pH inferior a 6.5 y que desarrolla actividad hidrolítica en presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . Esta es una enzima que cataliza en condiciones de acidificación, como en el caso de citotoxicidad por ionóforos o bien en condiciones de hipertermia. Los autores argumentan que el papel del  $\text{Zn}^{2+}$  en proteger las células de apoptosis es cuestionable, pues este catión tiene influencia en muchas reacciones bioquímicas, entre las cuales está su habilidad de inhibir los canales de calcio. De acuerdo con esto, el zinc puede actuar al modificar la homeostasis iónica, lo cual es consistente con su incapacidad de inhibir la digestión de ADN por la DNasa II.

En plantas el conocimiento es aún más limitado pero se han descrito actividades de nucleasa en distintos organismos. Thelen y Northcote (1989) describen la identificación y purificación de una nucleasa que participa durante un estadio particular de la diferenciación celular característico del desarrollo del xilema de *Zinnia elegans* L. Los autores detectan un polipéptido de 43 kDa en geles de actividad usando ARN o ADN de cadena sencilla como sustrato y la actividad máxima se registra a un pH de 5.5 en presencia de  $\text{Zn}^{2+}$  y ditioneitol. En tabaco, Mittler y Lam (1995) estudian la activación de la muerte celular por HR frente a la infección por el virus del mosaico del tabaco (TMV) y por la expresión de un gen bacteriano. Los autores reportan que la muerte celular está coordinada con la inducción de tres nucleasas: NUCI, de 100.5 kDa; NUCII, de 38 kDa y NUCIII, de 36 kDa. Estas actividades de nucleasa asociadas a HR no se inducen durante el envejecimiento, por estrés abiótico o en respuesta a ácido salicílico (usado para activar mecanismos de defensa de plantas). Posteriormente, los mismos autores (1997) describen la correlación entre el aumento en actividades de nucleasa y la hidrólisis del ADN nuclear durante la inducción de muerte celular por TMV, la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*; además por daño mecánico. Los autores detectan actividad de nucleasas (NUC35) a partir de fluido intercelular de hojas de tabaco. Estas nucleasas están compuestas por tres polipéptidos con propiedades

isoelectricas diferentes, y sólo el polipéptido de 36 kDa y pl 5.1 presenta una alta actividad nucleolítica. A partir de extractos de proteínas de hojas infectadas por TMV, descubren cuatro nucleasas diferentes, con las propiedades electroforéticas de NUC35 y distintos valores de pl( pl 5.6, 36 kDa; pl 5.1, 36 kDa; pl 5.1, 38 kDa).

Aún con esta información disponible, todavía se conoce poco sobre los sucesos entre la activación del programa de muerte celular por alguna señal extracelular y la degradación del ADN. Villa, *et al.* (1998) suponen que la proteólisis de actina es un paso necesario de apoptosis, pues al tratar neuronas con inhibidores de la proteasa calpaina se previene la fragmentación de actina y también la del ADN. Los autores concluyen que la hidrólisis de actina ocurre en un sitio de unión a la DNasa I, que probablemente inhibe su actividad nucleolítica, y libera a la nucleasa. Otro dato que aportan es que sólo se degrada actina nuclear por acción de la calpaína.

La activación de nucleasas durante el proceso de respuesta ante un elicitador es un fenómeno clave capaz de determinar la efectividad de la respuesta. Así pues, dentro de un contexto fisiológico, la activación de nucleasas y la degradación del ADN genómico, además de distintas series de pasos intermedios, deben jugar un papel muy importante en la resistencia del organismo.

En este trabajo se presenta la caracterización inicial de cuatro actividades de nucleasa, de las cuales 3 son inducidas por FB1 (Fig. 10 y Tabla 2). Sin embargo, también se encontró una banda de actividad constitutiva, es decir, presente en todos los extractos de proteínas de ejes embrionarios (NU50). Esta banda probablemente represente un conjunto de nucleasas presentes durante el desarrollo normal del maíz, como la actividad de nucleasa reportada por Mino, *et al.* (1987).

Entre las nucleasas descritas, probablemente haya algunas con actividad de DNasa y RNasa. Así pues, la NU70 puede ser la misma proteína marcada como R1 (Tabla 2), pues ya se ha descrito que existen nucleasas que tienen afinidad por el  $Zn^{2+}$  y pueden digerir tanto ADN de cadena sencilla como ARN (Adams, *et al.* 1992; Thelen y Northcote 1989).

Al parecer, la inducción de actividades de nucleasa por FB1 en ejes embrionarios de maíz depende de manera proporcional a la dosis y tiempo de exposición (Fig. 7 y 8). Posiblemente, la FB1 es capaz de inducir no sólo activación de nucleasas, sino también de enzimas responsables de síntesis y reparación de ADN. Por otro lado, la estimulación de actividad nucleolítica incluye bandas de actividad con diferentes afinidades catiónicas (Fig. 10); sin embargo, todas estas actividades de nucleasa se detectaron a un pH ligeramente básico (7.7, Fig. 11). Estos datos indican que la activación de las distintas nucleasas está regulada al menos de dos maneras diferentes: por modificación de las concentraciones catiónicas o por modificación del pH intracelular. Con los datos presentados en este trabajo no es posible saber si la fumonisina B1 es capaz de modificar de manera directa o indirecta la homeostasis iónica o el pH. Posiblemente las alteraciones producidas por la FB1 ocurren a niveles distintos, de tal manera que el daño podría inducir la activación de programas de defensa.

En resumen, con respecto a este trabajo, se evaluó la integridad del ADN y actividad de nucleasas, los cuales son parámetros importantes para estimar el estado fisiológico de la planta. En presencia de FB1, ocurren varios fenómenos propios de la inducción de respuesta de tipo hipersensible (HR), de los cuales se evaluaron la integridad del ADN genómico y la inducción simultánea de actividades de nucleasa. Desconocemos si alguno de estos polipéptidos con actividad de DNasa sean secretados al medio por el eje embrionario o sólo actúen dentro de la célula, lo cual significaría que la respuesta del maíz ante la presencia de una toxina de este tipo es activa o pasiva con respecto al patógeno. Además, hizo falta medir actividad de polimerasas, para estimar la síntesis de ADN en presencia de FB1. Este dato, proporcionaría más evidencias sobre el efecto de la toxina sobre el metabolismo del ADN en maíz. Por otro lado, las evidencias aquí presentadas indican un modo de acción de la FB1, pues la activación de nucleasas y la degradación del ADN genómico posiblemente son parte de la respuesta al ataque de un patógeno o productos secretados por éste como son las toxinas. La FB1 posiblemente induce múltiples fenómenos que alteran significativamente el metabolismo del ADN.

Considerando lo anterior, la fumonisina B1 induce la activación de nucleasas que conducen a la degradación del ADN genómico como una respuesta propia del maíz

frente a una molécula ajena. Para un estudio más completo de las nucleasas presentes en los ejes embrionarios será necesario la purificación de las nucleasas y su posterior caracterización isoeléctrica; que facilitaría su comparación con otras nucleasas reportadas. Además, para comparar las condiciones reales del efecto de la toxina en el sistema que se usó, será necesario medir el pH interno y las concentraciones catiónicas celulares, para clarificar el mecanismo de acción de la FB1 y alguno de sus pasos intermedios. También es necesario medir los niveles endógenos de esfingolípidos en presencia y ausencia de FB1 y el efecto de éstas sobre nucleasas.

### **B. Consideraciones metodológicas.**

Para la realización de los experimentos presentados aquí fue necesario modificar varios de los protocolos originales en algunos aspectos, y en otros casos en pasos clave para la realización de la técnica y su montaje en el laboratorio.

De acuerdo al tipo de experimentos que se hicieron, la mejor manera de observar la degradación del ADN genómico es haciendo la extracción y tefir con bromuro de etidio para ver a través de un transiluminador de luz UV. Es importante realizar la extracción del ADN en forma muy cuidadosa y evitar su daño por manipulación, pues el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la integridad del ADN después de un tratamiento con FB1. Fue por ello que el método presentado aquí está orientado hacia una manipulación mínima del ADN, partiendo de cantidades pequeñas de tejido. También por esta razón se decidió trabajar sólo con las regiones meristemáticas de los ejes embrionarios. Dado que los meristemas son tejidos en proliferación, resultaría más significativo estudiar los efectos de la toxina sobre la integridad del ADN en esta región, además que en estudios previos se observó degradación significativa del ADN al extraer de el eje embrionario completo.

La eliminación del ARN de la preparación de ácidos nucleicos extraídos de ejes embrionarios requiere forzosamente la incubación con RNasa. Este es un paso necesario para evitar ruido al observar la integridad del ADN. En la mayoría de los protocolos, la incubación con RNasa es seguido por una extracción con fenol, que podría causar un aumento en la degradación del ADN y para reducir la manipulación del ADN y su fragmentación, se agregó RNasa directamente al gel de agarosa, o bien, en el buffer de

corrida antes de hacer la electroforesis. Esta modificación permitió obtener imágenes "limpias" de ADN sin ARN.

Otra técnica más sensible para visualizar el ADN fue la de hibridación con una sonda homóloga, que en principio permite detectar fragmentos en un número alto de copias a lo largo del genoma. Esta técnica es un poco más sensible que la tinción, pero requiere mucho más tiempo.

Para detectar actividad de nucleasa es necesario que el tratamiento previo al análisis de las proteínas permita la renaturalización de las mismas y fue por ello que se trabajó en condiciones semidesnaturalizantes. Este tratamiento hace posible la separación electroforética de proteínas extraídas, mas sin embargo, debido al mismo tratamiento la migración de los polipéptidos es anómala y no se puede conocer el peso molecular con exactitud. Con respecto a las técnicas de detección de actividad de proteínas la tinción con plata ofrece una sensibilidad alta, pero se emplea demasiado tiempo y los reactivos son caros. Además que un paso necesario es la remoción de proteínas lavando con SDS. Son recomendables la tinción con bromuro de etidio y con azul de toluidina, aunque para esta última se requiere mayor cantidad de ADN en el gel para poder detectar actividad. Otra diferencia importante entre las técnicas de tinción usadas es la manera de unión del colorante al sustrato. En el caso del bromuro de etidio, se conoce que se intercala entre las bases nitrogenadas de las cadenas de ADN o ARN y es fácilmente detectable por luz UV debido a su cromóforo. El azul de toluidina se une al ADN por atracción de cargas, y es ampliamente utilizado como colorante básico para teñir núcleos de células, pero esta característica es la que no permite detectar diferencias sutiles al teñir ADN incorporado a geles de poliacrilamida. La incorporación de ARN al gel de actividad, requiere cuidados especiales, pues se deben evitar al máximo las ribonucleasas presentes; para lograr esto, es necesario limpiar perfectamente los vidrios y la cámara de electroforesis y trabajar con soluciones estériles. Aún con estos cuidados, es difícil obtener geles teñidos uniformemente, debido al gradiente de albúmina a lo largo del gel (y probablemente también de pH).

Un defecto del sistema usado para estudiar la actividad de nucleasa fue que posiblemente no obtuvimos un buen indicador del fenómeno *in vivo*, pues no se midieron las concentraciones de los distintos iones en los ejes embrionarios ni el pH.

La incorporación de albúmina al gel de poliacrilamida, facilitó la recuperación de la actividad de las proteínas separadas por electroforesis, pero también crea interferencia con la tinción por bromuro de etidio o azul de toluidina, la cual se observa como una línea arriba de la mitad del gel.

## **IX. Conclusiones**

1. La fumonisina B1 induce la degradación del ADN genómico de ejes embrionarios en la región meristemática, desde una concentración de FB1 de 1  $\mu\text{M}$ , pero alcanza un máximo a 10  $\mu\text{M}$  y depende del tiempo de exposición.

2. La fumonisina B1 provoca la activación de 3 proteínas con actividad de nucleasa que tienen diferentes pesos moleculares y diferentes requerimientos iónicos.

3. La actividad de las nucleasas varía de acuerdo a la dosis de fumonisina B1 y el tiempo de exposición.

4. Las nucleasas estudiadas tienen mayor actividad a un pH 7.7 y en presencia de magnesio.

5. La activación de nucleasas y la subsecuente degradación del ADN pueden ser efecto de la activación de un programa de muerte celular en respuesta a la inducción por un metabolito ajeno.

6. Se montaron métodos en el laboratorio para extraer ADN genómico íntegro a partir de cantidades pequeñas de tejido y para determinar nucleasas en geles de actividad.

## X. Anexo. Soluciones usadas.

### A. Imbibición

#### Buffer de imbibición 2X

KCl	50 mM	<u>RNasa</u>
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	RNasa A 10 mg/mL
Tris-HCl	50 mM pH 7.6	Tris-HCl 10 mM, pH 7.5
sacarosa	2%	NaCl 15 mM
ampicilina o cloramfenicol	10 mg/mL	hervirla 15 min y enfriar
esterilizar 15 min a 15 psi		lentamente

#### Solución estándar de fumonisina

Fumonisina B1 de ICN Biomedical ®, No. catálogo 11 6355-83-0  
esterilizada por filtración. Disuelta en agua a una concentración de 1 mM.

### B. Extracción de ADN genómico y electroforesis

#### Buffer de extracción

Tris-HCl	100 mM pH 8.0
EDTA	50 mM
NaCl	500 mM
2-mercaptoetanol	10mM

#### Buffer TAE 50X

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
Na <sub>2</sub> EDTA·2 H <sub>2</sub> O	37.2 g

llevar a un volumen final de 1 L con agua  
desionizada estéril  
ajustar el pH a 8.5

#### Buffer TE

Tris-HCl	50 mM pH 8.0
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	10 mM



### Buffer de carga de ADN

glicerol	50%
Na-EDTA, pH 8.3	0.2 M
azul de bromofenol	0.05%

### **C. Transferencia de ácidos nucleicos**

#### Solución desnaturizante

NaCl	1.5 M	87.75 g
NaOH	0.5 M	20.00 g
H <sub>2</sub> O desionizada		1 L

#### Solución de neutralización

NaCl	3M	175.5 g
Tris-HCl	0.5M	70.2g
H <sub>2</sub> O desionizada		1 L

#### SSC 20X

		para preparar 1 L
NaCl	3 M	175.5 g
Citrato de sodio·2 H <sub>2</sub> O	0.3 M	88 g
H <sub>2</sub> O desionizada		1 L
ajustar a pH 7.0 con HCl 1 M.		

## D. Prehibridación e hibridación

### Solución de hibridación

	para preparar 10 mL	Concentración final
SSC	3 mL de SSC 20 X	6 X
Reactivo de Denhardt *	0.5 mL del reactivo 100 X	5 X
SDS	0.25 mL de SDS 20 %	0.5 %
ADN de esperma de salmón	100 µL de ADN 10 mg/mL	100 µg/mL

### \* Reactivo de Denhardt 100 X (Guardar en alícuotas a -20°C)

BSA	1 g
PVP	1 g
Ficoll	1 g
agua	50 mL

## LAVADO DE MEMBRANAS

### Solución de lavado

	para 200 mL	concentración final
SSC	10 mL SSC 20X	1 X
SDS	1 mL SDS 20%	0.1 %

## E. Marcaje de la sonda RNAr

Se usaron los reactivos de DuPont NEN ® "Random primer fluorescein labeling kit with antifuorescein-HRP" (número de catálogo NEL803).

### Incubación y bolqueo del anticuerpo

#### 1. Buffer 1

Tris-HCl	0.1 M pH 7.5
NaCl	0.15 M

## 2. Buffer 2

Tris-HCl            0.1 M pH 7.5

NaCl                0.15 M

Reactivo bloqueante (Blocking Reagent) 0.5 % (p/v)

## 3. Solución de anticuerpo conjugado (Antibody Conjugate Solution, Conjugate in Buffer

2)

Tris-HCl            0.1 M pH 7.5

NaCl                0.15 M

Reactivo bloqueante (Blocking Reagent) 0.5 % (p/v)

Conjugado Antifluoresceína-HRP 1/1000 (v/v)

## **F. Detección por quimioluminiscencia de ácidos nucleicos marcados.**

Se usaron los reactivos de NEN® "Nucleic acid chemiluminescence reagent", con número de catálogo NEL201.

## **G. Extracción y cuantificación de proteínas**

**Tabla 7. Buffer de extracción de proteínas**

SOLUCIÓN	Para 10 mL	Solución stock	CONCENTRACIÓN FINAL
Tris	700 µL	1 M pH 8.0	70 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 µL	1 M	1 mM
KCl	250 µL	1 M	25 mM
sacarosa	0.843 g	---	0.25 mM
2-mercaptoetanol	10 µL	15 M	15 mM
Tritón X-100	10 µL	100%	0.1%
EDTA	100 µL	0.5 M	5 mM
Coctel de inhibidores	0.016 g	---	---
H <sub>2</sub> O	9.01 mL	---	---

### Coctel de inhibidores

Tabletas Complete ® de Boehringer, no. de catálogo 1 697 498. Son inhibidores de proteasas de serina, cisteina y metaloproteasas, así como de calpainas.

### Reactivo de Bradford

Coomasie brillante G (Brilliant blue G®, Sigma)	0.25 g
HClO <sub>4</sub> 70% de pureza	25.9 mL
H <sub>2</sub> O	aforar a 500mL

## **H. Electroforesis**

Soluciones para electroforesis en gel de poliacrilamida

### Buffer de corrida 4X

Tris	0.1 M pH 8.3
glicina	0.77 M

### Buffer de corrida 1X

Buffer de corrida	1X
SDS	0.1%

### Buffer de gel de resolución 4X

Tris-HCl	1.5 M pH 8.8
SDS	0.4%

### Buffer del gel concentrador 4X

Tris-HCl	0.5 M pH 6.8
SDS	0.4%

### Buffer de carga 2X

Buffer del gel	25%
concentrador 4X	
SDS	2%
2-mercaptoetanol	5%
glicerol	20%
azul de bromofenol	0.0025%

### Solución estándar de acrilamida

acrilamida	20%
bisacrilamida	0.8%

### Solución de fijación

Metanol	50% (v/v)
ácido acético	10% (v/v)
agua	40%(v/v)

### Gel separador 15%

Buffer gel de resolución 4X	1.25 mL
agua	1.25 mL
Sol. estándar de acrilamida	2.5 mL
ADN de esperma de salmón (10 mg/mL)	150.0 µL
albúmina (fracción V)	50.0 µL
APS 10%	25.0 µL
TEMED	3.5 µL

### Gel concentrador

Buffer gel concentrador 4X	500.0 µL
agua	1.2 mL
Sol. estándar de acrilamida	266.0 µL
APS 10%	40.0 µL
TEMED	2.0 µL

## ESTÁNDARES DE ACTIVIDAD DE NUCLEASA

### DNasa I pancreática 10 mg/mL

DNasa I liofilizada 5 mg

Tris-HCl 0.5 M pH 7.5 20.0 µL

glicerol 50% 300 µL

MgCl<sub>2</sub> 1 M 12.5 µL

agua estéril 165 µL

### Histona 15 mg/mL

Histona liofilizada 7.5 mg

Tris-HCl 0.5 M pH 7.5 20.0 µL

glicerol 50% 300.0 µL

MgCl<sub>2</sub> 1 M 12.5 µL

agua estéril 165 µL

Ambas soluciones estándar fueron diluidas  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  órdenes de magnitud para probar la sensibilidad de las técnicas de detección de actividad de nucleasa. Al final se decidió trabajar con las diluciones  $10^{-5}$  de ambos estándares, por lo que se cargaban de 1 a 100 ng en los geles de actividad.

La DNasa I usada es purificada por Boehringer ® cuyo número de catálogo es 104 159 y la Histona tipo III de Sigma ®, número de catálogo H5505

### **I. Renaturalización.**

#### Buffer Tris 4mM

Tris-HCl 4mM pH 7.5

#### Buffer Tris-isopropanol

Buffer Tris 4mM 75 %

isopropanol 25 %

## J. Actividad de nucleasa

Soluciones usadas para evaluar requerimientos iónicos.

<u>Buffer Tris 4 mM</u>	Tris-HCl 4 mM pH 7.5
<u>Tris-Ca</u>	buffer Tris 4 mM ; CaCl <sub>2</sub> 2 mM
<u>Tris-Mg-Ca</u>	buffer Tris 4 mM ; MgCl <sub>2</sub> 2 mM; CaCl <sub>2</sub> 2 mM
<u>Tris-Mn 0.5</u>	buffer Tris 4 mM; MnCl <sub>2</sub> 0.5 mM
<u>Tris-Mn 2</u>	buffer Tris 4 mM; MnCl <sub>2</sub> 2 mM
<u>Tris-Zn 0.5</u>	buffer Tris 4 mM ; ZnSO <sub>4</sub> 0.5 mM
<u>Tris-Zn 2</u>	buffer Tris 4 mM ; ZnSO <sub>4</sub> 2 mM
<u>Tris-EDTA 0.5</u>	buffer Tris 4 mM; Na-EDTA 0.5 mM
<u>Tris-EDTA 5</u>	buffer Tris 4 mM; Na-EDTA 5 mM

Soluciones usadas para determinar pH de actividad.

<u>Buffer pH 4</u>	acetato de sodio 10 mM pH 4.3 ; MgCl <sub>2</sub> 2 mM
<u>Buffer pH 6</u>	PIPES 10 mM pH 5.8; MgCl <sub>2</sub> 2 mM
<u>Buffer pH 8</u>	Tris 10 mM pH 7.7; MgCl <sub>2</sub> 2 mM
<u>Buffer pH 10</u>	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH 10.6; MgCl <sub>2</sub> 2 mM

Las soluciones de incubación usadas para ensayar actividad de nucleasa, se presentan los nombres abreviados subrayados en las secciones de Materiales y métodos y Resultados.

## K. Tinción del ADN.

Para teñir el ADN que se usó en los geles de actividad, se emplearon bromuro de etidio, reactivo de plata y azul de toluidina.

**Reactivo oxidante BioRad ®**

Reactivo oxidante concentrado	5 mL
Agua desionizada	45 mL

**Reactivo de plata BioRad ®**

Reactivo de plata concentrado	5 mL
Agua desionizada	45 mL

**Solución reveladora BioRad ®**

Reactivo revelador	1.6 g
Agua desionizada	50 mL

**Azul de toluidina**

azul de toluidina	2% (p/v)
agua desionizada	

**Bromuro de etidio**

bromuro de etidio	500 mg
agua desionizada	<u>10 mL</u>

Usar una dilución 1: 1000 para teñir los geles.



XI. Bibliografía

Abbas HA, RN Paul, SO Boyette, SO Duke, RF Vesonder. 1992. Physiological and ultrastructural effects of fumonisin on jimsonweed leaves. *Can J Bot* **70**: 1824-1833.

Abbas HA, T Tanaka, SO Duke, JK Porter, EM Wray, I Hodges, AE Sessions, E Wang, AH Merrill Jr, RT Riley. 1994. Fumonisin- and AAL- toxin-induced disruption of lipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol* **106**: 1085-1093

Adams RLP, JT Knowler, DP Leader. 1992. The biochemistry of the nucleic acids. 11ª ed. Chapman & Hall.

Agrios GN. 1988. Plant pathology 3ª Ed, Academic Press, EUA.

Aist JR, WR Bushnell. 1991. Invasion of plants by powdery mildew fungi and cellular mechanisms of resistance, *In*: Cole GT, HC Hoch HC, 1991, The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Press, NY, pp 333-335.

Bárceñas-Guevara A. 1988. Relación del hongo *Fusarium* spp. con la leucoencefalomalacia y edema cerebral equinos Tesis de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México, DF. 105 p.

Barry MA, A Eastman. 1993. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch of Biochem and Biophys* **300**: 440-450.

Baxter GD, PJ Smith, MF Lavin. 1989. Molecular changes associated with induction of cell death in a human T-cell leukaemia line: putative nucleases identified as histones. *Biochem and Biophysical Res Commun* **162**: 30-37.

Bean GA, R Echandi. 1989. Maize mycotoxins in Latin America. *Plant Disease* **73(7)**: 597-600.

Bezuidenhout SO, WCA Gelderblom, CP Gorst-Allman, PM Horak, WFO Marasas, G Spiteller, R Vleggaar. 1988. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J Chem Soc Chem Commun* : 743-745.

Boone DL, BK Tsang. 1997. Non-isotopic technique for the identification of endonucleases involved in apoptosis. *Biotechniques* **22**:648-649.

Buckner B, D Janick-Euckner, J Gray, GS Johal. 1998. Cell-death mechanisms in maize. *Trends Plant Sci* **3(6)**: 218-223.

Bullerman LB. 1996. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. *Adv Exp Med Biol* **392**: 27-38.

Casacuberta JM, P Puigdomenech, B San Segundo. 1991. A gene encoding for a basic pathogenesis-related (PR-like) protein from *Zea mays*. Molecular cloning and induction by a fungus (*Fusarium moniliforme*) in germinating maize seeds. *Plant Mol Biol* **16**: 527-536 .

Casacuberta JM, D Raventós, P Puigdomenech, B San Segundo. 1992. Expression of the gene encoding PR-like protein PRms in germinating maize embryos. *Mol Gen Genet* **234(1)**: 97-104 .

Cruz-García F. 1997. Cambios bioquímicos en los estados pregerminativo y germinativo en semillas de maíz. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM, México, DF, p 28.

De la Porta SL, JA Wood, JB Hicks. 1983. A plant DNA miniprep preparation version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**: 1-21.

Deacon JW. 1993. Introducción a la micología moderna. Ed Limusa, México, DF.

Desjardins AE, RD Plattner, PE Nelson. 1994. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in Northeast Mexico. *Appl Env Microbiol* **60**: 1695-1697.

Desjardins AE, RD Plattner, TC Nelsen, JF Leslie. 1995. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. *Appl Environ Microbiol* **61**: 79-86

Desjardins AE, TC Plattner, DD Shackelford, JF Leslie, PE Nelson. 1992. Heritability of fumonisin B1 production by *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Appl Env Microbiol* **58**: 2799-2805.

Doehlert DC, CA Knutson, RF Vesonder. 1994. Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia* **127**: 117-121.

Doko RNB, A Visconti. 1994. Occurrence of fumonisins B1 ad B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Addit Contam* **11**: 433-439 (resuen).

Fukuda H, H Shima, RF Vesonder, H Tokuda, H Nishino, S Katoh, S Tamura, M Nagao. 1996. Inhibition of protein Serine/Threonine phosphatases by fumonisin B1, a mycotoxin. *Biochem and Biophys Res Commun* **220**:160-165.

Gaido ML, JA Cidlowski. 1991. Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. *J Biol Chem* **266**: 18580-18585.

Gelderblom WCA, K Jaskiewicz , WFO Marasas , PG Thiel , RM Horak , Vleggaar y NPJ Kriek. 1988. Fumonisins. Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1806-1811.

Gilchrist DG, H Wang, RM Bostock . 1995. Sphingosine-related mycotoxins in plant and animal diseases. *Can J Bot* 73: S459-S467.

Greenberg JT, A Guo , DF Klessig, FM Ausbel. 1994. Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77: 551-563.

Hannun YA y CM Linardic. 1993. Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-supresor lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1154:223-236.

Hannun YA. 1994. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 269: 3125-3128.

Huang C, M Dickman, G Henderson, C Jones. 1995. Repression of protein kinase C and stimulaion of cyclic AMP response elements by fumonisin, a fungal encoded toxin which is a carcinogen. *Cancer Res* 55: 1655-1659.

Jackson MA, LR Hlywka, PH Senthil, LB Bullerman, GM Musser. 1996. Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B1 in an aqueous model system. *J Agric Fodd Chem* 44: 906-912.

Lillehoj EB. 1987. The aflatoxin-in-maize problem: The historical perspective, *In*: Luber MS, EB Lillehoj, BL Renfro , eds, 1987, Aflatoxin in maize: A proceedings of the workshop. CIMMYT, México, DF, p 13-32.

Lynch DV, SR Fairfield. 1993. Sphingolipid long-chain base synthesis in plants. *Plant Physiol* 103: 1421-1429.

Lynch DV, RA Spence, KM Theiling, KW Thomas, MT Lee. 1993. Enzymatic reactions involved in ceramide metabolism *In*: Murata N y CR Somerville, eds, Biochemistry and molecular biology of membrane and storage lipids of plants. The American Society of Plant Physiologists. pp 183-190.

Lynch DV. 1993. Sphingolipids *In*: Moore, ed. Lipid metabolism in plants. CRC Press; 286-308.

Marasas WFO, PE Nelson, TA Toussoun. 1984. Toxigenic *Fusarium* species. Identity and micotoxicology. The Pennsylvania State University Press. EUA, p 216-246.

Marin S, V Sanchis, A Teixido , R Saenz, AJ Ramos, I Vinas, N Magan. 1996. Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Can J Microbiol* 42: 1045-1050.

Mariscal-Quintana MG, RM García-Escamilla, N García-Escamilla, J Torres-López, JA Bautista-Ordóñez, Rosiles-Martínez R. 1997. Efectos por la ingestión de inóculos de *A. flavus* y

*F. moniliforme* en la citomorfología de sangre y concentración de albúminas y globulinas séricas en conejos. *Vet Méx* 28: 75-81.

Mcgee DC. 1990. Maize diseases. A reference source for seed technologists. 2ª ed. APS Press.

Mino M, M Inoue. 1987. DNA synthesis and nuclease activity during germination of a heterotic F<sub>1</sub> hybrid of maize. *Can J Bot* 67: 73-75

Mittler R, E Lam. 1997. Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Mol Biol* 34: 209-221.

Mittler R, E Lam. 1995. Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *The Plant Cell* 7: 1951-1952.

Mittler R, V Shulaev, E Lam. 1995. Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. *The Plant Cell* 7: 29-42.

Murillo I, L Cavallarín, B San Segundo. 1997. The maize pathogenesis-related PRms protein localizes to plasmodesmata in maize radicles. *Plant Cell* 9: 145-156.

Murphy PA, S Hendrick, EC Hopmans, CC Hauck, Z Lu, G Buseman, Munkvold G. 1996. Effect of processing on fumonisin content of corn. *Adv Exp Med Biol* 392: 323-334.

Nelson PE. 1993. Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry, and significance. *Annu Rev Phytopathol* 31: 233-252.

Oishi K, B Zheng, JF Kuo. 1990. Inhibition of Na, K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J Biol Chem* 265(1): 70-75.

Pascale M, A Visconti, M Prończuk, J Chelkowsky. 1997. Accumulation of fumonisins in maize hybrids inoculated under field conditions with *Fusarium moniliforme* Sheldon. *J Sci Food Agric* 74: 1-6.

Peitsch MC, B Polzar, H Stephan, T Crompton, HR Macdonald, HG Mannherz, J Tschopp. 1993. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *The EMBO Journal* 12:371-377.

Ramasamy S, E Wang, B Henning, AH Merrill. 1995. Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. *Toxicol Appl Pharmacol* 133: 343-348.

Rosiles MR, J Bautista, VO Fuentes, F Ross. 1998. An outbreak of equine leukoencephalomalacia at Oaxaca, Mexico, associated with fumonisin B1. *J Vet Med Series A-Physiology Clinical Medicine* **45**: 299-302.

Rosiles MR, M García-Torres, FP Ross. 1996. Confirmación de la fumonisina B1 en ración y alimento para équidos que murieron por leucoencefalomalacia. *Vet Méx* **27**: 111-113.

Ross RF, LG Rice, RD Plattner, GD Osweiler, TM Wilson, DL Owens, HA Nelson, JL Richard. 1991. Concentrations of fumonisin B1 in feeds associated with animal health problems. *Mycopathologia* **114**: 129-135.

Riley J, E Wang, JJ Schroeder, ER Smith, RD Plattner, HA Abbas, HS Yoo, AH Merrill Jr. 1996. Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contribution factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. *Nat Toxins* **4**: 3-15.

Ryerson DE, MC Heath. 1996. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *The Plant Cell* **8**: 393-402.

Sahu SC, RM Epley, SW Page, GC Gray, CN Barton, MW O'donnell. 1998. Peroxidation of membrane lipids and oxidative DNA damage by fumonisin B1 in isolated rat liver nuclei. *Cancer Letters* **125**: 117-121.

Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 9.34-9.45.

Scholtens-Toma IMJ, MHAJ Joosten, PJGM De Wit. 1991. Appearance of pathogen-related proteins in plant hosts. Relationships between compatible and incompatible interactions. In: Cole GT, HC Hoch, 1991, The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Press, NY, pp 247-266.

Schroeder JJ, HM Crane, J Xia, DC Liotta, AH Merrill. 1994. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1. *J Biol Chem* **269**: 3475-3481.

Shephard GS, PG Thiel, S Stockenström, EW Sydenham. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn based products. *J AOAC International* **79**: 671-687.

Shier WT. 1992. Sphingosine analogs: an emerging new class of toxins that includes the fumonisins. *J Toxicol-Toxin Reviews* **11**: 241-257.

Shurtleff MC. 1980. Compendium of corn diseases. 2<sup>a</sup> ed. APS Press. EUA

Thelen mp y northcote DH. 1989. Identification and purification of a nuclease from *Zinnia elegans* L.: a potential molecular marker for xylogenesis. *Planta* **179**: 181-195.

Thiel PG, WF Marasas, EW Sydenham, GS Shepard, WC Gelderblom, JJ Nieuwenhuis. 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1089-1093.

Van Asch MAJ, FHJ Rijkenberg, TA Coutinho. 1992. Phytotoxicity of fumonisin B1, moniliformin and T-2 toxin to corn callus cultures. *Phytopathology* **82**: 1330-1332.

Villa PG, HJ Henzel, M Sensenbrenner, CE Henderson, B Pettmann. 1998. Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *J Cell Sci* **111**: 713-722.

Visconti A. 1996. Fumonisin in maize genotypes grown in various geographic areas. *Adv Exp Med Biol* **392**: 193-204.

Visconti A, MB Doko. 1994. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *J AOAC Int* **77**: 546-550.

Visconti A, MB Doko, C Bottalico, B Schruer, A Boenke. 1994. Stability of fumonisins (FB1 and FB2) in solution. *Food Addit Contam* **11**: 423-431.

Voss KA, CW Bacon, FI Meredith, WP Norred. 1996. Comparative subchronic toxicity studies of nixtamalized and water-extracted *Fusarium moniliforme* culture material. *Food Chem Toxicol* **34**: 623-632.

Wang E, WP Norred, CW Bacon, RT Riley, AH Merrill. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J Biol Chem* **266**: 14486-14490.

Wang H, J Li, RM Bostock, DG Gilchrist. 1996. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *The Plant Cell* **8**: 375-391.

Wu WI, VM McDonough, JT Nickels, J Ko, AS Fischl, TR Vales, AH Merrill, GM Carman. 1995. Regulation of lipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by fumonisin B1. *J Biol Chem* **270**: 13171-13178.

Xing T, VJ Higgins, E Blumwald. 1996. Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *The Plant Cell* **8**: 555-564.

Yin J-J, MJ Smith, RM Eppley, SW Page, JA Sphon. 1998. Effects of fumonisin B1 on lipid peroxidation in membranes. *Biochim Biophys Acta* **1371**: 134-142.

Yoder OC. 1980. Toxins in pathogenesis. *Ann Rev Phytopathol* **18**: 103-129.

Yoo HS, WP Norred, J Showker, RT Riley. 1996. Elevated sphingolipid bases and complex sphingolipid depletion as contributing factors in fumonisin-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **138**: 211-218.