

114



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

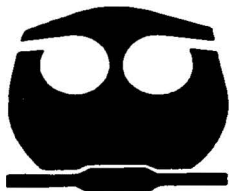
**EFEECTO DE LA FB<sub>1</sub> SOBRE LA PEROXIDACION  
DE LIPIDOS DE MEMBRANA PLASMATICA DE  
EMBRIONES DE MAIZ.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**SILVIA PALACIOS BAHENA**



**MEXICO D.F.**



**2002**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**



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.

## JURADO ASIGNADO

**Presidente:** Prof. Ma. Del Carmen Parra González

**Vocal:** Prof. Marina Gavilanes Ruíz

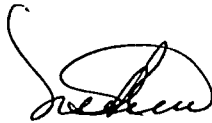
**Secretario:** Prof. Fernando Montiel Aguirre

**1er. Suplente:** Prof. Felipe Cruz García

**2do. Suplente:** Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra

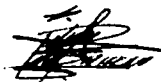
Sitio donde se desarrolló el tema:  
Laboratorio 101. Departamento de Bioquímica.  
Facultad de Química, UNAM.

Asesor del Tema:



Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Sustentante:



Silvia Palacios Bahena

---

## RECONOCIMIENTOS

Los experimentos de aislamiento e identificación de fosfolípidos y productos de peroxidación por HPLC se llevaron a cabo en el Depto. De Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, bajo la dirección del Dr. Mohammed El Hafidi.

Parte de los experimentos de extracción de lípidos, dienos conjugados y aductos con el MDA se realizaron en los laboratorios del Dr. Rolando Hernández y del DR. Antonio Peña, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM

Silvia Palacios Bahena realizó esta tesis de licenciatura gracias a una beca del proyecto DGAPA IN204097.

El trabajo de esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de los proyectos DGAPA IN204097, IN208300 (UNAM) y al proyecto CONACYT 25131-B

Este trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección de la Dra Marina Gavilanes Ruiz, en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

---

## AGRADECIMIENTOS

Que agradable tarea es recordar a todos aquellos que, de una forma u otra, han participado en la propia formación. Sirvan pues, estas líneas, como humilde homenaje tanto a los aquí mencionados, como aquellos a los que tal vez la mente ha olvidado, pero no el corazón.

Gracias a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, que siempre sigas viva y formando grandes hombres

Gracias a la **Facultad de Química**, donde se sufre y se lucha pero al final se aprende

A mis padres, **Roberto E. Palacios** y **Eufracia Bahena** por haberme dado una educación y una formación que constituyen la herencia más valiosa que me pudieron haber dado.

A mi chaparrito **E. Gustavo** por hacer de mi vida algo nuevo y diferente cada día, por tu comprensión y apoyo, por las cosas maravillosas que me has enseñado, por la alegría, por todas nuestras locuras y sueños que hemos compartido y por todo lo que falta.

A **Griselda** mi hermana por tu cariño y paciencia y principalmente por haberme ayudado a realizar mi carrera.

A todos mis hermanos y principalmente a **Sofía** por todo lo que hemos compartido juntos.

A todos mis sobrinos a quienes quiero mucho.

Agradezco al **Dr. Rolando Hernández** y a la **Biol. Lourdes Sánchez** del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM su valiosa ayuda técnica.

De manera muy especial agradezco al **Dr. Mohammed El Hafidi** por su valiosa ayuda y apoyo desinteresado.

Al **Dr. Antonio Peña** y al **Dr. Jorge Ramírez** por su gran apoyo en los tiempos de huelga

Agradezco al **Dr. F. Javier Plasencia de la Parra**, a la **Dra. Sobeida Sánchez Nieto**, a la **Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo** y a la **M. en C. Nora Andrea Gutiérrez Nájera** y en especial a la **Dra. Marina Gavilanes Ruíz** por el gran apoyo que siempre me han brindado.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 101.

A todos los miembros del jurado.

Con cariño a todos mis grandes amigos y compañeros incondicionales que he tenido a lo largo de mi vida, que siempre me han brindado su apoyo y su ayuda.

De manera muy especial, quiero dedicarte esta tesis a ti, **Marina**, pues más que una maestra y asesora, has sido una gran amiga para mí. Quiero agradecerte el haberme dado la oportunidad de trabajar con tigo. Gracias a tu paciencia y comprensión he logrado alcanzar esta importante meta. Deseo sinceramente que Dios te llene de bendiciones a ti y a tu familia.

**MUCHAS GRACIAS A TODOS**

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1. HONGOS PATÓGENOS DE GRANOS Y SEMILLAS</b>	1
1.1.1. Especies más comunes	2
1.1.2. Formas de infección	3
1.1.3. Daños en semilla, plántula y planta adulta	4
1.1.4. <i>Fusarium moniliforme</i>	7
<b>1.2. FUMONISINAS</b>	9
1.2.1. Estructura y propiedades	9
1.2.2. Formas moleculares de acción	10
1.2.3. Efecto en humanos animales y plantas	12
<b>1.3. LÍPIDOS</b>	13
1.3.1. Estructura	14
1.3.2. Clasificación	14
1.3.3. Propiedades	15
1.3.4. Funciones biológicas	18
1.3.5. Localización en las células	18
<b>1.4. MEMBRANAS BIOLÓGICAS</b>	19
1.4.1. Estructura	20
1.4.2. Propiedades	21
1.4.3. Funciones	21
1.4.4. Composición lipídica de las membranas plasmáticas	22
<b>1.5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO</b>	23

# ÍNDICE

1.5.1. Principales reacciones de formación de EROs en las células	23
1.5.2. Peroxidación de lípidos de membrana	26
1.5.3. Métodos de detección de lípidos peroxidados	27
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>29</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>30</b>
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
5.1 Material biológico	31
5.2. Germinación de embriones. Imbibición de los embriones de maíz híbrido H-355 y variedad Chalqueño	32
5.3. Obtención de Vesículas de Membrana Plasmática (VMP)	34
5.4. Obtención del homogenado de hígado de rata	35
5.5. Detección espectrofotométrica de lipoperoxidación (Método del TBA)	35
5.6. Detección espectrofotométrica de dienos conjugados	36
5.7. Detección por HPLC de fosfolípidos hidroperoxidados	37
5.8. Determinación de la concentración de proteína	37
5.9. Procedimientos estadísticos utilizados en preparaciones membranales independientes	38
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
6.1. Efecto de la FB1 en el rendimiento de la extracción de diferentes fracciones subcelulares de embriones de maíz.	39
6.2. Medición de peroxidación de lípidos membranales de embriones de maíz por el método del TBA	40
6.3. Medición de peroxidación de lípidos por la técnica de dienos conjugados en distintas fracciones subcelulares de embriones de maíz.	44
6.3.1. Efecto <i>in vitro</i> de la FB1 en la peroxidación de lípidos membranales	46
6.3.2. Efecto <i>in vivo</i> de la fumonisina B1 en la peroxidación de lípidos membranales	50



## **ÍNDICE**

6.4. Efecto <i>in vivo</i> de la fumonisina B1 en la peroxidación de lípidos de la membrana plasmática determinada por HPLC	55
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>59</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>68</b>

<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	
Tabla I: Clasificación taxonómica de los principales hongos patógenos de plantas.	3
Tabla II: Clasificación de los lípidos	15
Tabla III: Métodos de detección de lípidos peroxidados	28
Tabla IV: Rendimiento de proteína obtenido en las diferentes fracciones subcelulares de los embriones de maíz de la variedad Chalqueño que se embebieron en ausencia y presencia de fumonisina B <sub>1</sub> .	39
Tabla V: Niveles de dienos conjugados en membranas plasmáticas de embriones de maíz embebidos en ausencia y presencia de FB <sub>1</sub> expresados por mg de proteína y por mg de ácido graso.	54
Tabla VI: Determinación del perfil de los fosfolípidos más abundantes en VMP de embriones de maíz embebidos sin y con 20 µM de FB <sub>1</sub> .	56
Tabla VII: Detección por HPLC a 234 nm de los niveles de ácidos grasos peroxidados de embriones de maíz embebidos en ausencia y presencia de 20 µM de FB <sub>1</sub> .	57
Figura 1: Estructura de la fumonisina B <sub>1</sub> .	10
Figura 2: Estructura de la fumonisina B <sub>1</sub> y su posible disposición en la membrana.	11
Figura 3: Estructura básica de los ácidos grasos.	14
Figura 4: Representación estructural de bases esfingoideas y la fumonisina B <sub>1</sub> .	17
Figura 5: Modelo del mosaico fluido de la estructura de la membrana.	19
Figura 6: Representación del mecanismo de peroxidación de lípidos.	27
Figura 7: Niveles de aducto de TBA-producto oxidado de lípido en muestras de homogenado de hígado de rata con hepatectomía.	41
Figura 8a y 8b: Peroxidación de lípidos de membrana plasmática de embriones de maíz de la variedad Chalqueño medida con la técnica del TBA	43
Figura 9. Formación de dienos conjugados en diferentes fracciones subcelulares obtenidas de embriones de maíz híbrido H-355	45
Figura 10a: Formación de dienos conjugados por efecto de la FB <sub>1</sub> <i>in vitro</i> en microsomas de embriones de maíz variedad Chalqueño	46
Figura 10b. Formación de dienos conjugados por efecto de la FB <sub>1</sub> <i>in vitro</i> en VMP de embriones de maíz variedad Chalqueño.	47

Figura 11: Formación de dienos conjugados por efecto de la $FB_1$ <i>in vitro</i> en microsomas de embriones de maíz híbrido H-355.	48
Figura 12: Efecto del tiempo de pre-incubación de la $FB_1$ con VMP en la formación de dienos conjugados.	49
Figura 13: Formación de dienos conjugados en la fracción de homogenado y en la fracción microsomal por efecto de la adición <i>in vivo</i> de la $FB_1$ a embriones de maíz de la variedad Chalqueño.	50-51
Figura 14: Formación de dienos conjugados por efecto de la $FB_1$ <i>in vivo</i> en la fracción microsomal de embriones de la maíz variedad Chalqueño	52
Figura 15a: Formación de dienos conjugados por efecto de la $FB_1$ <i>in vivo</i> en VMP de embriones de la maíz variedad Chalqueño.	53
Figura 15b: Formación de dienos conjugados por efecto de luz y de la $FB_1$ <i>in vivo</i> en VMP de embriones de la maíz variedad Chalqueño.	54
Fig. 16: Cromatograma del perfil de los fosfolípidos más abundantes en VMP de embriones de maíz embebidos sin $FB_1$ .	56

## ABREVIATURAS

BHT	2,[6]-di-ter-butil-p-cresol (butilhidroxitolueno)
CSL	Sonda de spin electrónico de colestano
DGDG	Digalactosildiactilglicerol
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FB <sub>1</sub>	Fumonisina B <sub>1</sub>
g	gramo
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
MDA	Malondialdehído
MGDG	Monogalactosildiactilglicerol
mL	mililitro
µg	microgramo
µL	microlitro
µM	micromolar
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenglicol
PI	Fosfatidilinositol
TR	Tiempo de retención
n-SASL	Sonda de spin electrónico de ácido n-doxilesteárico (n = 5,7,12,o 16)
T-SASL	2,2,6,6-tetrametil piperidin-1-oxil-4-il-octadecenoato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEA	Trietilamina
UV	Ultravioleta
VMP	Vesículas de membrana plasmáticas

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. HONGOS PATÓGENOS DE GRANOS Y SEMILLAS

Los cereales son plantas de la familia de las gramíneas cuyos frutos, ricos en almidón, sirven para la alimentación del hombre y los animales. El término 'cereal' se utiliza para referirse a las semillas o granos de los vegetales de esta familia. Los más importantes son el trigo, centeno, arroz, maíz, cebada, mijo y avena. Constituyen la base de la alimentación humana y suministran entre el 50 y el 65 % del aporte energético recibido por el total de la población humana. Los cereales contienen, además de almidón, importantes cantidades de proteínas, sales minerales y vitaminas (Müller, 1981).

Durante el crecimiento de los granos de cereales se desarrolla sobre su superficie una microflora epífita que se alimenta de las secreciones normales de las células de la planta y que recubren su superficie. Secundariamente se da una contaminación de los granos por gérmenes procedentes del suelo y aire, sobretodo durante la fase de recolección. Cuando los granos son almacenados, su contenido en agua supera ciertos márgenes que los hacen susceptibles a sufrir ataques microbianos causados generalmente por hongos y bacterias (Müller, 1981).

Los hongos, incluyendo a aquellos que infectan granos, plantas y animales se clasifican como organismos eucariotes carbono-heterótrofos y basan su existencia en la relación saprófita, simbiótica o parásita que establecen con el hospedero. La mayoría de éstos son estrictamente saprófitos; se sabe que menos del 10% de aproximadamente 100,000 especies fúngicas conocidas son capaces de colonizar plantas y una pequeña fracción es capaz de causar enfermedad (Knogge, 1996), siendo capaces de invadir cultivos enteros antes de que sean cosechados y aún de invadir granos y semillas antes de que éstos sean consumidos por humanos y animales domésticos, causando epidemias devastadoras que originan cuantiosas pérdidas económicas (Pitt and Hocking, 1999).

Los hongos fitopatógenos se dividen en dos grandes categorías de acuerdo al tipo de célula huésped en la cual basan su crecimiento (Clarkson, 1992)

**Necrótrofos:** causan un extenso daño al tejido y derivan su nutrición de células muertas o que están muriendo debido a la degradación de la pared celular

**Biótrofos:** obtienen sus nutrientes de la célula hospedera viva y causan un menor daño al tejido en la infección temprana. Este grupo representa a los patógenos más significativos económicamente.

Los hongos que se presentan en los cultivos y causan daño son generalmente llamados hongos del campo, éstos son capaces de adaptarse fácilmente a las diferentes condiciones climáticas que interfieren con la gradual maduración del grano, ya que en esta etapa el grano no cuenta con una capa protectora apropiada, ni con compuestos químicos efectivos que lo protejan de la colonización microbiana. Por otra parte, a los hongos que dañan y alteran la calidad de los granos almacenados se les llama hongos de almacén, mejor conocidos como mohos, éstos prevalecen aún bajo condiciones de almacén controladas (Chelkowski, 1991).

### 1.1.1. Especies más comunes

Entre las especies de hongos contaminantes más frecuentes encontrados en granos y semillas destacan los géneros de mohos y levaduras que a continuación se mencionan:

- **MOHOS:** *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Geotrichum*, *Gleosporium*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sporotrichum*, *Trichotecium*, *Absidia*, *Thamnidium*.
- **LEVADURAS:** *Candida*, *Rhodotorula*, *Mycoderma*, *Torulopsis*.

Además de éstos, existe una gran diversidad de hongos patógenos de plantas, de los cuales sólo se mencionarán las divisiones y clases de mayor importancia en la Tabla I.

Tabla I. Clasificación taxonómica de los principales hongos patógenos de plantas.

División	Clase	Ejemplos
<b>Mixomicota</b> (poseen plasmodium o pseudoplasmodium).	Plasmodiophoromicetos	- <i>Plasmodiophora brassicae</i> (raíz de brassica club) <i>Polymyxa graminis</i> y <i>P. betae</i> (patógenos de raíz de cereal )
<b>Eumicota</b> (unicelular o micelio filamentosos). Subdivisión: Ascomicotina (esporas sexuales = ascosporas).	Plectomicetos	-Moho polvoso: <i>Erysiphe spp.</i> Ejemplo <i>E. graminis</i> (cereales). <i>Podosphaera leucotricha</i> (manzana), <i>Uncinula necator</i> (vino).
	Pirenomicetos	
	Disomicetos	- <i>Ophiostoma ulmi</i> (destrucción del olmo), <i>Endothia parasitica</i> (destrucción de la castaña).
<b>Deuteromicotina</b> (estado sexual ausente o desconocido).	Loculoascomicetos	- <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (tallo y raíz), <i>Pyrenopeziza brassicae</i> (manchas leves en las hojas de Brassica)
	Coleomicetos	
	Hyphomicetos	- <i>Ophiobolus graminis</i> (cereal), <i>Pyrenophora teres</i> (cebada), <i>Helminthosporium maydis</i> (destrucción de las hojas de maíz del sur)
<b>Basidiomicotina</b> (las esporas sexuales son basidiosporas)	Hemibasidiomicetos	- <i>Ascochyta pisi</i> (destrucción del guisante), <i>Septoria tritici</i> (manchas en las hojas del trigo)
	Hymenomicetos	- <i>Alternaria spp.</i> (manchas en las hojas y destrucción de éstas), <i>Botrytis cinerea</i> (mojo gris), <i>Fulvia fulva</i> (mojo en las hojas del tomate), <i>Fusicarium spp.</i> (putrefacción de raíz).  - <i>Ustilago spp.</i> Por ejemplo: <i>U. maydis</i> (causante del hollín), <i>Hemileia vastatrix</i> (enmohece al café)  - <i>Armillariella mellea</i> (putrefacción de raíz, hongo de la miel), <i>Chondrostereum purpureum</i> (ciruelo / hoja de cereza de plata)
<b>Mastigomicota</b> (produce zoosporas móviles).	Oomicetos	<i>Pythium spp.</i> , <i>Phytophthora spp.</i> (raíz, tallo), <i>Phytophthora infestans</i> (destrucción de la papa), Mojo, por ejemplo <i>Bremia lactucae</i> (lechuga) y <i>Plasmopora viticola</i> (vino)

### 1.1.2. Formas de infección

Para que se lleve a cabo el proceso de infección por un hongo patógeno, primero debe existir un encuentro entre el patógeno y el hospedero que origine la interacción planta-patógeno. Esta interacción se dará de acuerdo al grado de selección de las especies de plantas hospederas que tenga el patógeno, lo cual se ve reflejado en tres niveles diferentes de especialización que van de acuerdo con los mecanismos de interacción que se establecen entre la planta y el patógeno. En el primer nivel se encuentran los parásitos oportunistas que penetran a la planta a través de heridas o requieren de plantas débiles para su colonización, estos hongos fitopatógenos se caracterizan por contar con un amplio rango de plantas hospederas, su virulencia es relativamente baja y causan enfermedades poco severas. El segundo nivel incluye a los patógenos verdaderos que requieren de plantas vivas para su crecimiento y que pueden sobrevivir fuera del huésped sólo bajo ciertas circunstancias; la mayoría de los principales patógenos de plantas se encuentran en este nivel, muchos son altamente virulentos y cuentan con un número limitado de especies hospederas. En el tercer nivel, de complejidad más alta, se encuentran los patógenos obligados, los cuales requieren exclusivamente de plantas vivas para completar su ciclo de vida.

Una vez que se ha dado la interacción planta-patógeno, para que la colonización de la planta por el patógeno se dé eficientemente, éste debe desarrollar estrategias que le permitan invadir los tejidos de la planta, optimizar su crecimiento dentro de ella y propagarse a través del organismo; paralelamente, la planta desarrollará barreras de defensa para prevenir la infección, originándose una batalla dinámica entre la utilización de estrategias altamente específicas tanto por parte del patógeno, como por parte del huésped. Cuando el patógeno logra penetrar al tejido de la planta, en muchos casos lo hace mediante procesos que involucran la secreción de un coctel de enzimas hidrolíticas y proteolíticas específicas del tipo de hongo del que se trate y del tipo de huésped al que se enfrente (Knogge, 1996).

Existen diferentes formas por las cuales el hongo puede penetrar al tejido del hospedero y causar infección, por su importancia destacan las siguientes:

**Penetración a través de aberturas naturales.-** Las plantas presentan varios tipos de aberturas naturales que están relativamente sin protección y por tanto, son



vulnerables a la invasión por hongos. La ruta de entrada más común del patógeno a la planta son los estomas, que se encuentran bajo la superficie de las hojas, y que tienden a estar abiertos durante el día y cerrados por la noche.

**Heridas.-** Las heridas en la superficie de las plantas son el sitio ideal de penetración para el hongo. El daño puede resultar por influencia del medio ambiente, actividades de animales e insectos, etc. y también por procesos naturales de las plantas, por ejemplo, los sitios emergentes de la raíz. Las áreas dañadas pueden exudar materiales nutrientes para los hongos.

**Penetración directa -** Está claro que la adhesión de invasores potenciales a la superficie de las plantas es importante. Algunas especies fúngicas producen vainas mucilaginosas, las cuales cubren a la hifa; además producen otras sustancias adhesivas que provocan un contacto más cercano, por ejemplo, polisacáridos, glicoproteínas, polímeros de hexosamina y xilanos.

**Mecanismos químicos de penetración.-** Una vez que el patógeno se aproxima a la pared celular, muchos son capaces de producir ataques bioquímicos en los tejidos de la planta y la célula como apoyo para extender su penetración. Ocurren entonces muchas interacciones complejas que dan como resultado un daño celular y el desarrollo de síntomas de enfermedad. Existen dos tipos de armas bioquímicas, la primera se refiere a enzimas de alto peso molecular capaces de destruir la pared celular y de provocar la ruptura de células epidérmicas al contacto, originando así la maceración del tejido del hospedero; la segunda se refiere a la producción de toxinas de bajo peso molecular capaces de matar a las células mientras la invasión de la hifa continúa su avance al interior del tejido hospedero (Isaac, 1991)

### **1.1.3. Daños en semilla, plántula y planta adulta**

Muchos de los hongos patógenos causan la producción de síntomas característicos en la planta hospedera durante el desarrollo de la planta, en diferentes partes de su anatomía. El desarrollo de los síntomas está influenciado por el ambiente y la salud del huésped al momento de la infección (Isaac, 1991).

**Daños en semilla:**

La invasión del hongo puede ocurrir en diferentes sitios del grano. los primeros síntomas serán invisibles para el ojo humano, pero conforme la colonización avanza, se van desarrollando distintas alteraciones que cambian la apariencia normal del grano. por ejemplo, puede ocurrir un cambio de color, observarse enmohecimiento, pudrición y deformación del grano. En los granos almacenados, además de las alteraciones de apariencia, ocurren otras alteraciones importantes como son la acidificación, aparición de gases, degradación de determinadas sustancias contenidas en los granos y en ocasiones, acúmulo de metabolitos tóxicos como micotoxinas. Todo lo anterior origina que las semillas disminuyan y en algunos casos pierdan su capacidad de germinación, además de adquirir propiedades tóxicas (Chelkowski, 1991)

**Daños en plántula y planta adulta:**

Después de que la planta ha sido infectada, ésta puede mostrar cambios dramáticos en su crecimiento y productividad, apareciendo también otras alteraciones que van acompañadas por cambios en su ultraestructura y fisiología. Los síntomas que se presentan generalmente son los siguientes:

**Reducción en el crecimiento:** En la mayoría de los casos, éste es un importante síntoma de enfermedad que se manifiesta como una reducción en el rendimiento de un cultivo, esto es, hay disminución en número, tamaño y calidad de frutos, granos, semillas, flores, etc. Muchos de estos efectos se originan por la ruptura del tejido fotosintético y la perturbación de otros procesos (incremento en la velocidad de respiración, cambios de nutrientes y en la relación de agua por ejemplo) como resultado de la invasión patogénica.

**Enfermedad por moho:** El enmohecimiento puede ocurrir como una infección devastante que puede causar grandes desastres económicos y es originada por parásitos obligados, mismos que se propagan con mucha facilidad a través del aire. Las infecciones comúnmente ocurren en tallos, vainas y hojas en una enorme variedad de plantas, cultivos de trigo y otros cereales, árboles y plantas de ornato

**Necrosis:** El término necrosis es usado para describir la muerte de tejidos infectados. Durante el desarrollo de la enfermedad, la necrosis puede extenderse y provocar rápidamente la muerte de la planta entera o puede estar restringida a zonas

aisladas. Las manchas necróticas aparecen en las hojas de la planta infectada como resultado de la muerte celular localizada.

**Roya:** El término roya se refiere a enfermedades en la planta que causan ennegrecimiento de las hojas y otros órganos de la planta y se aplica frecuentemente a infecciones que se extienden muy rápidamente.

**Humedecimiento:** La enfermedad debida a exceso de agua puede afectar a todos los tipos de plantas, pero afecta principalmente a las plántulas, ya que las raíces y la base del tallo son infectados por hongos patógenos necrótrofos. Al inicio de la infección aparecen lesiones oscuras. Las células afectadas se hinchan y posteriormente se colapsan, lo que puede provocar la rápida muerte de la planta entera.

**Escabro:** Este término es usado para describir las lesiones necróticas superficiales que son formadas como resultado a la invasión al hospedero. En algunas infecciones estas lesiones van acompañadas por la formación de corcho bajo la epidermis o por asociación del micelio fúngico. La epidermis eventualmente se rompe para liberar las esporas fúngicas.

**Antracnosis:** Es el nombre común de enfermedades de plantas caracterizadas por una lesión negruzca con acumulación de esporas negras y micelio en algunos casos.

**Manchas en las hojas:** Pequeñas manchas de necrosis aparecen en las hojas de la planta. Estas lesiones reducen efectivamente la capacidad fotosintética de las hojas y cuando el hongo esporula, la relación de agua puede ser alterada debido a la ruptura de la cutícula. La infección temprana afecta la superficie de las hojas de la planta que gradualmente se van tiñendo de negro. Las manchas causan pequeños problemas en la planta, a menos que la infección sea muy severa, pero en términos económicos causa problemas debido al aspecto de la hoja.

**Úlceras:** Las lesiones necróticas las cuales aparecen hundidas dentro del tejido de la planta son llamadas úlceras. Estas zonas pueden ser rodeadas por un sobrecrecimiento del tejido de la planta, el cual ocurre como respuesta al efecto causado por la herida. Cuando el daño ocurre debajo del tejido vascular de la planta la infección puede ser fatal.

**Clorosis:** Un gran número de enfermedades produce una coloración amarillenta en las hojas de la planta infectada. Estos síntomas son frecuentemente atribuidos a una deficiencia de hierro en las hojas, produciendo una reducción en la síntesis de clorofila. Este síntoma puede asociarse con el efecto del hongo patógeno en los cloroplastos.

**Marchitamiento:** Las condiciones de sequía dan como resultado la pérdida de turgencia en las hojas y como consecuencia la planta se marchita. A menos de que el suministro de agua sea restringido o prolongado, esta condición es reversible. El marchitamiento causado por la invasión de hongos patógenos es generalmente irreversible y puede progresar y afectar toda la planta con relativa rapidez.

**Deformaciones y frenado del crecimiento:** Un gran número de infecciones causadas por hongos patógenos produce alteraciones en las características morfológicas del tejido de la planta hospedera y afecta el desarrollo normal de la planta. Se utilizan términos como hipoplasia cuando el desarrollo normal de la planta se ve frenado. Una reducción de la división celular puede ser un mecanismo primario para este efecto. Hiperplasia es un término que se utiliza cuando el tejido de la planta crece en exceso, generalmente como resultado de la división celular incrementada. Hipertrfia describe un crecimiento excesivo debido al alargamiento de las células individuales

#### ***1.1.4. Fusarium moniliforme***

*Fusarium moniliforme* es un hongo patógeno que se extiende en zonas húmedas y tropicales, se desarrolla colonizando la semilla de algunas plantas, especialmente las gramíneas como el maíz, el trigo y el sorgo, es uno de los principales parásitos de plátanos, piñas y tomates almacenados, generalmente causa pudrición y produce toxinas llamadas fumonisinas, moniliforminas y fusarinas (Blaney, 1999). En el hombre y animales ocasiona desarrollo de cáncer esofágico, hepático y otras afecciones relacionadas con el consumo de granos contaminados con fumonisinas. También es uno de los agentes etiológicos de la queratitis micótica, la cual se manifiesta por inflamación y ulceración de la córnea en el hombre (Bonifaz, 1994).

*Fusarium moniliforme* es un hongo que en un cultivo puro sobre un medio de papa-dextrosa-agar presenta las siguientes características macroscópicas y microscópicas (Nelson *et al.* 1983):

**Macroscópicas:** Las colonias presentan abundante micelio aéreo de crecimiento rápido, color rosado claro en su cara superior y salmón intermedio en su cara inferior.

**Microscópicas:** Hay la presencia de escasos macroconidios con 3 a 7 septos. Es común la presencia de una gran cantidad de microconidios catenulados formados a partir de monofialides.

## 1.2. FUMONISINAS

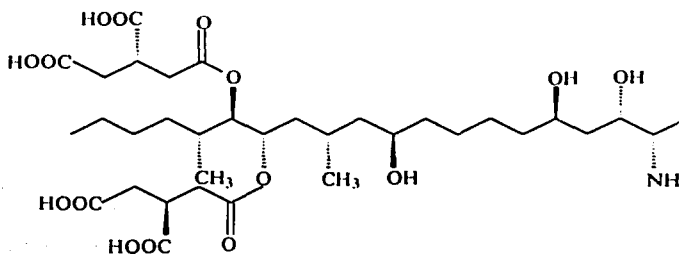
Las micotoxinas son sustancias naturales producidas por cierto tipo de hongos, los cuales crecen en productos agrícolas bajo ciertas condiciones particulares. Estas micotoxinas están ampliamente distribuidas en la naturaleza en donde los granos y semillas son susceptibles a ser dañados antes y después de la cosecha (Dawson, 1999). Un grupo de micotoxinas que ha adquirido gran importancia es el de las fumonisinas, toxinas producidas principalmente por el hongo *Fusarium moniliforme*, un hongo asociado con la contaminación del maíz y otros cereales (Abado-Becognee *et al.* 1998)

La fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) ha sido recientemente identificada como una micotoxina producida por *Fusarium moniliforme* y especies relacionadas, es encontrada en cereales contaminados por *F. moniliforme*, particularmente en el maíz en muchas partes del mundo (Trenholm *et al.* 1999). Esta fumonisina ha sido químicamente caracterizada como el agente causal de una amplia variedad de efectos toxicológicos asociados con la ingesta de maíz y otros productos alimenticios contaminados. Existen seis tipos de fumonisinas, la FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>, FA<sub>1</sub> y FA<sub>2</sub>, sólo la serie B forma parte de productos naturales y de éstas, las que suelen encontrarse con más frecuencia y las más importantes son la fumonisina B<sub>1</sub> que representa el 70 % de la fumonisinas totales y la fumonisina B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub>, que son encontradas en menor cantidad (Bezuidenhout *et al.* 1988). Estas micotoxinas han sido descubiertas recientemente y se están realizando muchos estudios de toxicidad y de control, puesto que se conoce aún poco de ellas.

### 1.2.1. Estructura y propiedades

La estructura de las primeras fumonisinas (Fig. 1) fue dilucidada en 1988 como resultado de extensas investigaciones realizadas para entender mejor su ocurrencia, toxicología y química bio-orgánica (Yin *et al.* 1996a). La estructura química de las fumonisinas consta de una cadena hidrocarbonada de 20 carbonos con propiedades anfipáticas por la presencia de un grupo amino libre y con cuatro grupos carboxilos que le confieren una alta polaridad y solubilidad en agua. La fumonisina B<sub>1</sub> es una molécula que no tiene una forma geométrica definida, se presenta como un sólido amorfo (Gelderblom *et al.* 1988), con un punto de fusión de 103 a 105 °C (Dupuy *et al.* 1993) su peso molecular es de 721.3484 g/mol, mientras que el peso molecular de la FB<sub>2</sub> y la

FB<sub>3</sub> es de 705.3935 g/mol (éste no varía ya que ambas son isómeros estructurales). La FB<sub>1</sub> es una molécula anfipática soluble en agua, metanol o acetonitrilo, sin embargo su parte hidrofílica hace que no sea soluble en disolventes no polares. La fumonisina B<sub>1</sub> se puede hidrolizar tanto en medio ácido [6M HCL] como básico [ 0.05 a 2 M KOH], liberando dos residuos de ácido propantricarboxílico y un aminopoliol respectivamente (Scott, 1993). La FB<sub>1</sub> es termoestable y los procedimientos termoquímicos actuales utilizados para esterilizar los alimentos o en su elaboración son insuficientes para destruirla ( Dupuy *et al.* 1993).



Fumonisin B<sub>1</sub>

Fig. 1 Estructura de la Fumonisin B<sub>1</sub> (Momamy and Dombrink 2001).

### 1.2.2. Formas moleculares de acción

Debido a que las fumonisinas tienen cierta similitud estructural con la esfingosina, la cual constituye el esqueleto covalente de la esfingomielina, cerebrosidos y otros esfingolípidos, condujo a que se realizaran estudios tanto *in vivo* como *in vitro* que han demostrado que las fumonisinas son inhibidores potentes de la biosíntesis de los esfingolípidos actuando específicamente sobre la enzima ceramida sintetasa (la cual es una enzima clave en la biosíntesis de esfingolípidos complejos), produciendo como consecuencia la acumulación de bases esfingoideas como la esfinganina, la esfingosina y la fiteosfingosina que se encuentra en plantas (Merril *et al.* 1993). Otros estudios han reportado que estas bases esfingoideas son también inhibidores potentes de cinasas C de proteínas y de ATPasas de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> en animales. Por otra parte, se ha reportado que la FB<sub>1</sub> también es inhibidor de las fosfatasas de proteínas las cuales se encuentran

involucradas en el control de actividades biológicas (Huang *et al.* 1995, Fukuda *et al.* 1996).

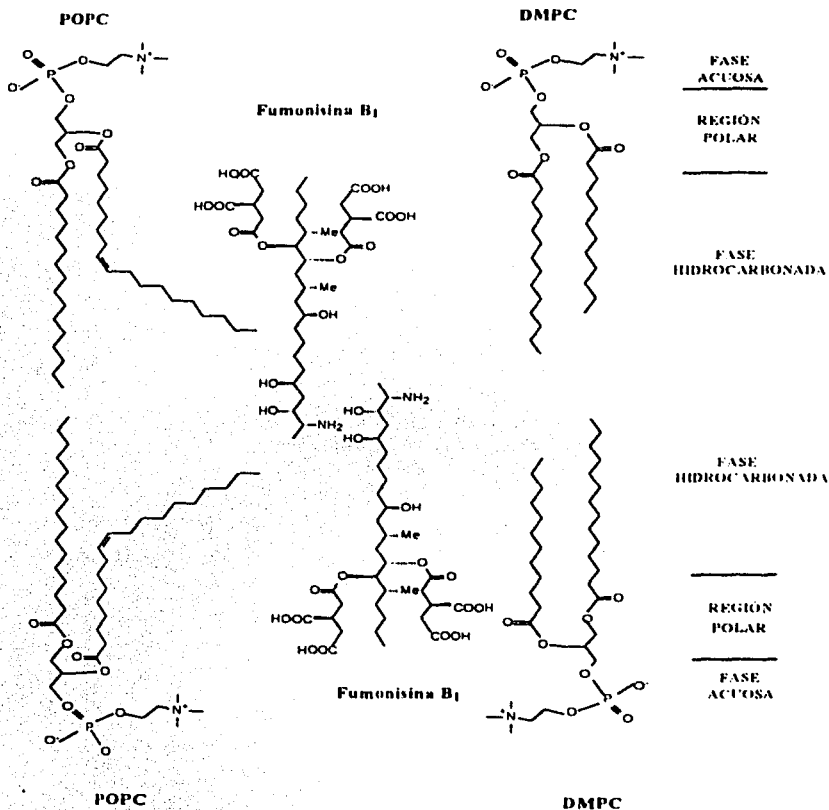


Fig. 2 Estructura de la fumonisina B<sub>1</sub> y su posible disposición en la membrana (Yin *et al.* 1996a).

Como ya se ha mencionado, la FB<sub>1</sub> presenta un esqueleto de naturaleza hidrofóbica con grupos tricarbónicos, hidroxilo y amino, los cuales le confieren polaridad. Estas características sugieren que la FB<sub>1</sub> podría interactuar tanto con la fase

lipídica, como con los componentes proteicos de las membranas biológicas. Se ha reportado que las fumonisinas actúan incrementando la oxidación de los lípidos de membrana, promueven la producción de radicales libres y aceleran las reacciones en cadena asociadas con la peroxidación lipídica en sistemas membranales modelo, como por ejemplo los liposomas, en donde la interacción de la FB<sub>1</sub> con la bicapa de éstos parece ser a nivel de la parte polar de los fosfolípidos, perturbando así la estructura membranal (Fig. 2) y provocando con esto, un aumento en la permeabilidad que aumenta a su vez la difusión de productos con alto contenido de oxígeno o del oxígeno mismo, a través de la membrana (Yin *et al.* 1998).

### 1.2.3. Efectos en humanos, animales y plantas

Se ha reportado que las micotoxinas producen ciertos efectos que pueden ser dramáticos en la salud de humanos y animales de granja que se alimentan de productos agrícolas contaminados (Nelson, 1993). Para que esto suceda, deben existir algunos factores que condicionen la aparición de una micotoxicosis en animales y/o humanos causadas por la ingestión de plantas contaminadas por algún hongo patógeno. Algunos de estos factores son: (a) la infección de una planta hospedera que es susceptible a una micotoxicosis causada por un hongo; (b) la capacidad genética del patógeno para producir uno o varios metabolitos tóxicos para el ser humano y/o animales; (c) factores ambientales que sean favorables al desarrollo de la enfermedad; (d) condiciones ambientales favorables a la producción y acumulación de cantidades suficientes de metabolitos tóxicos en la planta enferma para causar toxicosis al consumidor, (e) el consumo de cantidades suficientes de plantas contaminadas con la toxina para que pueda provocar la micotoxicosis en el consumidor susceptible (Marasas *et al.* 1987). La fumonisina B<sub>1</sub> es una toxina que se encuentra estructuralmente relacionada con una actividad promotora de cáncer de esófago en humanos, ya que en áreas donde se han localizado varios casos de cáncer de esófago se han encontrado altas concentraciones de la toxina FB<sub>1</sub> en muestras de maíz contaminado, por lo que las fumonisinas se consideran posibles causantes del cáncer esofágico (Nair, 1998).

Entre las enfermedades asociadas con el consumo de maíz contaminado con fumonisinas está la leucoencefalomalacia equina, que es una enfermedad neurotóxica que ataca a caballos, burros, mulas y conejos. Se caracteriza por necrosis de la materia



blanca en uno o ambos hemisferios cerebrales y es producida por la ingestión de maíz contaminado por *F. moniliforme*. La FB<sub>1</sub> también es causante del edema pulmonar porcino. En experimentos con animales se demostró que es extremadamente tóxica y que producía cáncer hepático en ratas al darles alimento contaminado con fumonisina B<sub>1</sub> (Marasas, 1985).

Se ha mostrado también que la fumonisina B<sub>1</sub> puede afectar varios procesos fisiológicos en plantas, algunos de estos son: en plantas de maíz, las fumonisinas reducen el crecimiento de la raíz y de los retoños y seca la mayor parte de la plantula (Lamprecht et al. 1994), en embriones de maíz, la fumonisina B<sub>1</sub> causa un incremento en la fuga de electrolitos e inhibe la hidrólisis de ATP de la ATPasa de H<sup>+</sup> tanto *in vitro* como *in vivo* a una concentración de 10 y 20 µM (Gutiérrez-Nájera, 1999) y en retoños de maíz se ha comprobado que la FB<sub>1</sub> es un potente inhibidor de la enzima esfingamina N-acil-transferasa (Lynch, 2000). En hojas de tomate la fumonisina B<sub>1</sub> puede causar la formación de lesiones necróticas (Abbas et al. 1994), a una concentración de 1 µM promueve la salida de electrolitos y la pérdida de clorofila (Abbas y Vesonder, 1993), aumenta los niveles de fitoesfingosina y esfingamina en callo de tabaco, lenteja de agua y en hojas de tomate a concentraciones de 1 µM, 5-70 µM y 14 µM respectivamente (Abbas et al. 1994). En trabajos recientes se ha reportado que la fumonisina B<sub>1</sub> induce respuestas como la generación de especies reactivas de oxígeno, deposición de compuestos fenólicos y callosa, acumulación de fitoalexinas y expresión de genes RP (Stone et al. 2000).

### 1.3. LÍPIDOS

Los lípidos son biomoléculas orgánicas insolubles en agua, que pueden extraerse de las células y de los tejidos mediante disolventes no polares. Los lípidos constituyen una de las cuatro principales clases de compuestos, los cuales son encontrados en todos los organismos vivos y desempeñan un papel indispensable en el mantenimiento de la vida, los otros son carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos (Goodwin and Mercer 1983).

### 1.3.1. Estructura

Las estructuras de los lípidos son con frecuencia complejas, aunque comparten ciertas características comunes. Los lípidos más sencillos son los *ácidos grasos*, que son ácidos monocarboxílicos de la fórmula general R-COOH, en donde R representa una cola de hidrocarburo (Fig. 3). Se han identificado más de 100 ácidos grasos diferentes en los lípidos de microorganismos, plantas y animales. Estos ácidos grasos difieren unos de los otros en la longitud de sus colas hidrocarbonadas, su grado de insaturación (número de dobles enlaces carbono-carbono en la cola hidrocarbonada), y en las posiciones de esos dobles enlaces carbono-carbono en sus cadenas de ácidos grasos (Horton *et al.* 1995).

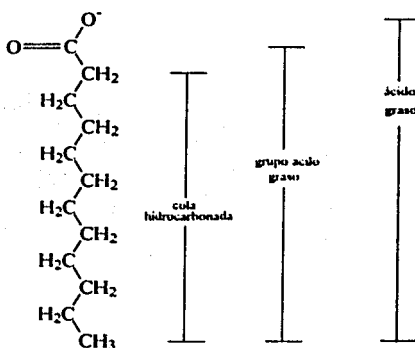


Fig. 3 Estructura básica de los ácidos grasos (Horton *et al.* 1995).

### 1.3.2. Clasificación

La clasificación más empleada de los lípidos es la que se basa en las estructuras de sus esqueletos (Tabla II).

Los *lípidos complejos*, se caracterizan porque contienen ácidos grasos como componentes. comprenden a los *acilglicéridos*, los *fosfoglicéridos*, los *esfingolípidos* y

las *ceras*, que difieren en la estructura de los esqueletos a los que se hallan unidos los ácidos grasos. También reciben el nombre de *lipidos saponificables* porque producen jabones (sales de los ácidos grasos) por hidrólisis alcalina. El otro grupo de lipidos está constituido por los *lipidos simples*, que no contienen ácidos grasos y no son, por tanto, saponificables.

Tabla II Clasificación de los lipidos (Lehninger, 1995).

Tipo de lípido	Esqueleto
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Complejos (saponificables)</i></li> <li>Acilglicéridos</li> <li>Fosfoglicéridos</li> <li>Esfingolípidos</li> <li>Ceras</li> </ul>	Glicerina 3-fosfato de glicerilo Esfingosina Alcoholes no polares de peso molecular elevado
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Simple (insaponificables)</i></li> <li>Terpenos</li> <li>Esteroides</li> <li>Prostaglandinas</li> </ul>	

### 1.3.3. Propiedades

Existen diferentes familias o clases de lipidos, pero las propiedades distintivas de todos ellos derivan de la naturaleza hidrocarbonada de la porción principal de su estructura. Por ejemplo, los *ácidos grasos* saturados e insaturados difieren significativamente en sus configuraciones estructurales. En los ácidos grasos saturados las cadenas hidrocarbonadas pueden existir en un número infinito de conformaciones, porque cada uno de los enlaces sencillos del esqueleto carbonado posee una completa libertad de rotación. Los ácidos grasos insaturados presentan uno o más quiebres rígidos en sus cadenas hidrocarbonadas, originados por la incapacidad de rotación del enlace o enlaces dobles. En los *triacilglicéridos* por ejemplo, su punto de fusión viene determinado por sus ácidos grasos componentes y aumenta, en general, con el número y la longitud de los ácidos grasos saturados componentes. En cuanto a solubilidad, los triacilglicéridos son relativamente insolubles en agua, y no tienden, por sí mismos, a formar micelas muy dispersas mientras que los diacilglicéridos y los monoacilglicéridos poseen una polaridad apreciable a causa de sus grupos hidroxilo libres, y por ello forman micelas. Los acilglicéridos son solubles en éter, cloroformo y benceno, así como

en etanol caliente. experimentan hidrólisis cuando se hierven con ácidos o con bases, o por acción de las lipasas. Otra clase de lípidos complejos componentes principales de las membranas plasmáticas son los *fosfoglicéridos*, estos son sólidos blancos de consistencia ccrea, por exposición al aire se obscurecen y experimentan cambios complejos a causa de la tendencia de sus ácidos grasos no saturados a peroxidarse por la acción del oxígeno atmosférico. Los fosfoglicéridos son solubles en muchos disolventes no polares que contengan cierta cantidad de agua, y son extraídos adecuadamente de las células y los tejidos mediante mezclas de cloroformo-metanol. Los fosfoglicéridos presentan variaciones en el tamaño, la forma, la polaridad y la carga eléctrica de las cabezas polares, estas variaciones desempeñan, probablemente, un papel significativo en la estructura de diversos tipos de membranas celulares. Los *esfingolípidos*, lípidos complejos cuyo esqueleto está constituido por la esfingosina o una base relacionada son componentes importantes de las membranas de la células vegetales y animales. Todos los esfingolípidos contienen tres componentes básicos característicos: una molécula de un ácido graso, una molécula de esfingosina o de uno de sus derivados, y un grupo de cabeza polar, el cual, en algunos esfingolípidos, es muy grande y complejo. La esfingosina es un aminoalcohol de cadena larga hallado en los esfingolípidos de diversas especies. En los mamíferos las bases principales de los esfingolípidos son la esfingosina (4-esfinganina) y la dihidroesfingosina (esfinganina); en las plantas superiores y en las levaduras la base principal es la fitoesfingosina (4-hidroesfinganina). La base esfingosina se halla unida por su grupo amino, mediante un enlace amida, a un ácido graso saturado de cadena larga o a un monoinsaturado de 18 a 26 átomos de carbono. La toxina en estudio (fumonisina B<sub>1</sub>) tiene similitud estructural con la esfingosina, ya que contiene un esqueleto de naturaleza hidrofóbica similar al de la esfingosina con grupos tricarbónicos, hidroxilo y amino, los cuales le confieren polaridad. Estas características sugieren que la FB<sub>1</sub> podría interactuar tanto con la fase lipídica, como con los componentes proteicos de la membrana plasmática. Se reportado que la FB<sub>1</sub> actúa incrementando la velocidad de oxidación de los lípidos de membrana, promueve la producción de radicales libres y acelera las reacciones en cadena asociadas con la peroxidación lipídica en sistemas membranales modelo (Fig. 4).

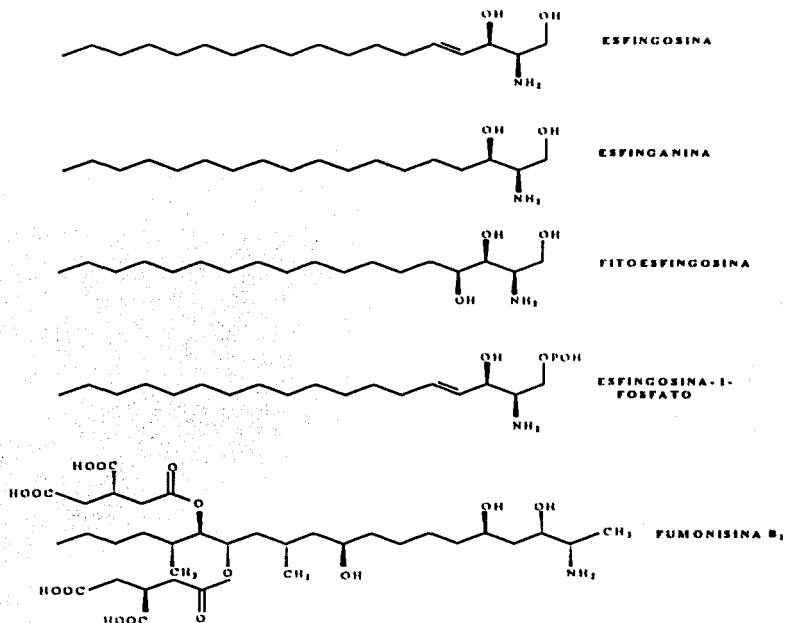


Fig. 4. Representación estructural de bases esfingoides y la fumonisina B<sub>1</sub>.  
(Nelson, 1993).

Las *ceras* son ésteres sólidos de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes grasos monohidroxilicos o con esteroides y son insolubles en agua. Cuando se calientan son blandas y moldeables, y en frío son duras. Forman cubiertas protectoras de la piel, pelo y plumas, de las hojas y frutos de las plantas superiores, así como del exoesqueleto de muchos insectos (Lehninger, 1995).

### **1.3.4. Funciones biológicas**

Los lípidos desempeñan diversas funciones biológicas importantes, actúan como componentes estructurales de las membranas, como formas de transporte y almacenamiento del combustible catabólico, como cubierta protectora sobre la superficie de muchos organismos, y como componentes de la superficie celular relacionados con el reconocimiento de las células, la especificidad de especie y la inmunidad de los tejidos.

### **1.3.5. Localización en las células**

Las diferentes clases de lípidos se encuentran distribuidos en los diferentes organelos celulares, así, por ejemplo, los esteroides, glicolípidos y fosfolípidos son los componentes principales característicos de las membranas celulares de vegetales y animales. El plasmalema contiene principalmente fosfolípidos, glicolípidos, esteroides y lípidos neutros. Los glicerofosfolípidos (monofosfatidilgliceroles, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina) se encuentran en gran cantidad en la membrana del cloroplasto y tilacoidal, en la membrana mitocondrial los principales fosfolípidos son fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina y en menor cantidad fosfatidilinositol. En los glioxisomas y peroxisomas se encuentran principalmente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. En la fracción subcelular microsomal (definida también como pellet de membranas y que comprende membranas del retículo endoplásmico, aparato de Golgi, tonoplasto, fragmentos de plasmalema, etc.), predominan los lípidos polares, de éstos los fosfolípidos son los más abundantes. En el núcleo, los fosfolípidos son los principales lípidos de membrana. Los glicerofosfolípidos son los componentes lipídicos de menor abundancia en las semillas, en donde los triglicéridos son los que predominan. Los triacilglicéridos se encuentran como lípidos de depósito o de reserva en células de animales y plantas (por ej. en semillas, polen, flores y raíz), distribuidos por todo el citoplasma de la célula, estos triglicéridos de almacenamiento se conocen como esferosomas, oleosomas o cuerpos lipídicos (Goodwin and Mercer 1983) En las plantas los esferosomas o cuerpos lipídicos son formados durante el desarrollo de la semilla como apoyo al crecimiento de la planta (Huang, 1996).

#### 1.4. MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Las células vegetales contienen un número de organelos y sistemas membranosos incluyendo cloroplastos, mitocondria, peroxisomas, Golgi, tonoplasto, retículo endoplásmico y una variedad de pequeñas vesículas bien definidas y un núcleo, todos embebidos en el citoplasma y encerrados por una membrana plasmática, la cual está rodeada por una pared celular. La relativa rigidez de la pared celular le confiere a la célula estabilidad y protección contra daños mecánicos, mientras que la membrana plasmática le confiere a la célula un medio relativamente constante para llevar a cabo el metabolismo intracelular, llevando a cabo un intercambio balanceado de metabolitos con el resto del organismo y sus alrededores (Larsson *et al.* 1990).

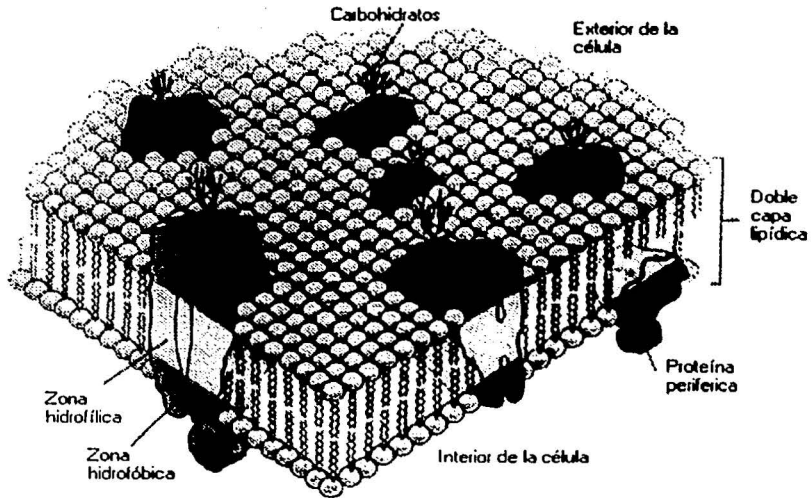


Fig.5. Modelo del mosaico fluido de la estructura de la membrana.

### 1.4.1. Estructura

Las membranas biológicas han sido representadas satisfactoriamente con el modelo del mosaico fluido propuesto por Singer y Nicholson en 1972 (Fig. 5). El modelo postula que las membranas biológicas están constituidas principalmente por una doble capa de lípidos anfipáticos (por ejemplo: fosfolípidos, glicolípidos y esteroides), en la cual se encuentran intercaladas proteínas específicas o en contacto de manera superficial por interacciones iónicas; además, las membranas contienen carbohidratos, pero en poca cantidad.

Los aspectos importantes de este modelo son:

- A. La mayoría de las moléculas de fosfolípidos y glicolípidos de membrana están en forma de bicapa que funciona como disolvente para las proteínas integrales de la membrana y como una barrera de permeabilidad.
- B. Una pequeña proporción de los lípidos de las membranas interacciona específicamente con determinadas proteínas y pueden ser esenciales para la función de éstas.
- C. Las proteínas de la membrana pueden difundir lateralmente en la matriz lipídica, a menos que queden restringidas por interacciones especiales, mientras que pueden tener cambios conformacionales aún en la parte transmembranal (Stryer, 1990).

Las proteínas de membrana se asocian de dos maneras con la bicapa lipídica (Fig. 5)

1) están unidas a las superficies hidrofílicas de la bicapa y se llaman *proteínas periféricas o superficiales de la membrana* y, 2) se encuentran embebidas en la región hidrofóbica de la bicapa y se denominan *proteínas integrales de la membrana*.

1.- *Proteínas periféricas* pueden asociarse con las caras hidrofílicas de la bicapa lipídica debido a interacciones no covalentes entre los grupos polares de los lípidos y las cadenas laterales polares de sus propios aminoácidos superficiales (Bohinski, 1991). Se disocian de las membranas mediante procedimientos relativamente suaves que dejan intacta la membrana, tales como la exposición a soluciones salinas de elevada fuerza iónica (por ej., NaCl 1M), agentes quelantes de metales o cambios de pH. Las proteínas periféricas son estables en soluciones acuosas y no se unen a lípidos.



2.- *Proteínas integrales* dependen de interacciones hidrofóbicas para asociarse con las membranas. Este tipo de proteína membranal requiere que las cadenas laterales de aminoácidos apolares queden expuestas en su superficie para asociarse con las cadenas apolares de los hidrocarburos que integran la matriz interna de la bicapa. Estas proteínas sólo se pueden separar de la membrana mediante tratamiento con agentes que la destruyan. Entre éstos se encuentran los disolventes orgánicos, detergentes ( por ej. dodecil sulfato de sodio (SDS) y desoxicolato de sodio) y agentes caotrópicos (iones que destruyen la estructura del agua).

#### 1.4.2. Propiedades

Todas las membranas biológicas son distintas en estructura y función, sin embargo, comparten ciertas propiedades importantes:

- Las membranas son estructuras laminares, de pocas moléculas de grosor, que forman espacios cerrados entre compartimentos de distinta composición.
- Las membranas constan principalmente de lípidos y proteínas y en menor cantidad contienen hidratos de carbono enlazados a las partes polares de lípidos y proteínas
- Los lípidos de membrana son moléculas relativamente pequeñas que contienen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica y que en medios acuosos forman láminas continuas formadas por dos capas contrapuestas que constituyen obstáculos al flujo de moléculas polares.
- Ciertas proteínas específicas son mediadoras de funciones características de las membranas. Las proteínas de membrana se encuentran intercaladas en las bicapas lipídicas, las cuales crean un ambiente adecuado para la acción de estas proteínas
- Las membranas son estructuras fluidas, constituyen asociaciones no covalentes de carácter cooperativo y son asimétricas.

#### 1.4.3. Funciones

Las membranas llevan a cabo diversas funciones que resultan ser esenciales para la vida. Las membranas plasmáticas confieren a las células su individualidad al separarlas de su entorno, constituyen barreras de permeabilidad muy selectivas, que contienen sistemas de transporte que regulan la composición iónica y molecular del

medio interno, controlan el flujo de información entre las células y llevan a cabo un intercambio balanceado de metabolitos con el resto del organismo y sus alrededores (Stryer, 1990).

#### **1.4.4. Composición lipídica de las membranas plasmáticas**

Todas las membranas biológicas consisten de una doble capa de lípidos, la cual constituye el armazón en el cual las proteínas de membrana están ancladas.

Esteroles, glicolípidos y fosfolípidos son los principales lípidos de membranas plasmáticas en plantas y en animales. Cabe mencionar que la mayoría de los esteroles se encuentran libres. De éstos, el sitosterol, campesterol y estigmasterol predominan en las plantas, mientras que en los animales el colesterol es el que predomina. En algunas especies se han encontrado otros esteroles que son poco comunes como el cicloartenol que se encuentra en la avena, el espinasterol, estigmastanol y el 7-estigmastenol en la espinaca. Además de los ésteres libres se han encontrados también ésteres de esteroles, glicósidos y glicósidos acilados, los cuales parecen ser más abundantes en las membranas plasmáticas de plantas que de animales. La composición de los esteroles varía de un órgano a otro de la planta así como de la raíz y la hoja (Larsson *et al.* 1990).

El glucocerebrósido es el principal glicolípido en la membrana plasmática de plantas, se encuentran también en pequeñas cantidades el monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y el digalactosildiacilglicerol (DGDG).

La fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) son los principales fosfolípidos en membranas plasmáticas de plantas y animales, la PC es algunas veces sustituido por el equivalente esfingomielina en las membranas plasmáticas de animales. En las membranas de plantas el ácido fosfatídico (PA) es el tercero más abundante y le sigue a la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina que se encuentran en mayor cantidad. El fosfatidilinositol (PI) juega un papel importante en la transducción de señales a través de la vía del ciclo de fosfoinosítidos y está presente en menores cantidades (Rochester *et al.* 1987).

Los principales ácidos grasos de las membranas plasmáticas de las plantas son los ácidos palmítico (16:0), ácido linoléico (18:2), y el ácido linolénico (18:3), lo cual contrasta con las membranas plasmáticas de animales, en donde predominan el ácido

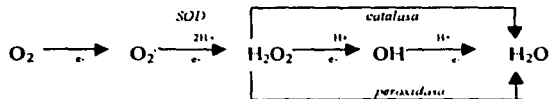
palmitico, el ácido esteárico (18:0) y el ácido araquidónico (20:4). A pesar de estas diferencias, el grado de insaturación de los ácidos grasos en la membrana plasmática es similar en las membranas plasmáticas de plantas y animales (Larsson *et al.* 1990)

### 1.5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Los animales así como las plantas han desarrollado una serie de mecanismos de defensa para protegerse de la invasión de organismos patógenos y parásitos. Una de las primeras líneas de defensa es la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) el cual juega un papel muy importante de defensa en las plantas y es frecuentemente la primera respuesta que se activa en muchas interacciones incompatibles (Hammond-Kosack and Jones, 1996)

#### 1.5.1. Principales reacciones de formación de EROs en las células

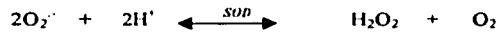
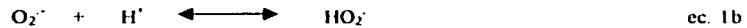
La mayoría de las células vegetales generan de manera rutinaria bajos niveles de EROs durante el transporte de electrones o en procesos enzimáticos involucrados en sistemas redox (Rustérucci *et al.* 1996) (ec. 1a), pero cuando se generan como una respuesta rápida al reconocimiento del patógeno debido principalmente a la presencia de fitotoxinas, se lleva a cabo un proceso conocido como *explosión oxidativa*, que consiste en una producción incrementada de especies reactivas de oxígeno (EROs), principalmente de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroperoxilo ( $HO_2$ ) en el sitio de invasión (Grant and Gary, 2000).



ec. 1a

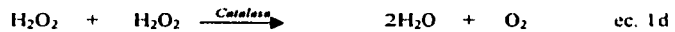
En las células vivientes el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) existe en equilibrio con su forma protonada, el radical hidroperoxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), (ec. 1b). El  $O_2^{\cdot-}$  generado es dismutado a  $H_2O_2$  y  $O_2$  por vía no enzimática o por acción de la enzima *superóxido dismutasa*

(SOD), (ec. 1c) la cual se localiza en el citosol, cloroplasto, mitocondria y en el espacio extracelular.

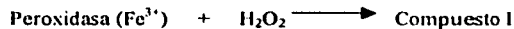


El  $H_2O_2$  al no tener electrones desapareados puede cruzar fácilmente la membrana plasmática, mientras que el anión superóxido lo hace más lentamente, por otra parte, el  $H_2O_2$  formado:

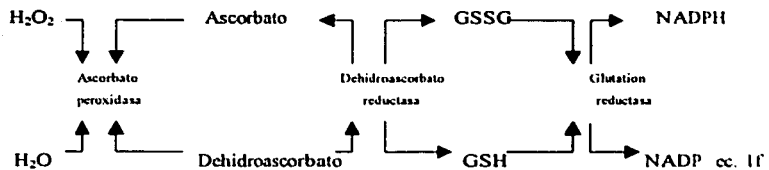
a) es descompuesto a  $H_2O$  y  $O_2$  espontáneamente o por acción de la enzima *catalasa*, la cual se localiza en microcorpúsculos llamados peroxisomas, (ec. 1d)



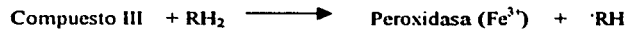
b) es utilizado como sustrato por varias peroxidasa,

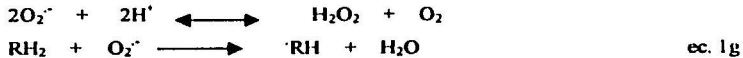


c) es detoxificado por acción del ascorbato peroxidasa actuando concertadamente con la dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa en la ruta de Halliwell-Asada (ec. 1f).

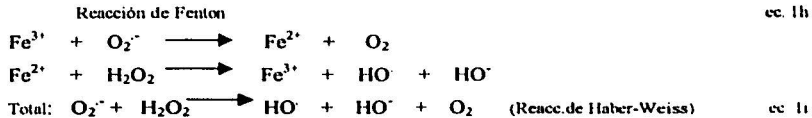


Sin embargo, bajo condiciones apropiadas, el  $H_2O_2$  puede ser generado por peroxidasa en una serie de reacciones que involucran la formación de compuestos III (Wojtaszek, 1997)(ec. 1g).





El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  puede entrar a la reacción de Fenton (ec. 1h) y generar el radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\cdot}$ ), éste es extremadamente destructivo y puede iniciar la peroxidación autopropagante de lípidos. Si el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que entra al citoplasma de la célula permanece a una concentración suficiente para alcanzar el núcleo del patógeno o el de la planta, éste podría reaccionar con iones metálicos intracelulares y producir  $\text{HO}^{\cdot}$ , el cual puede fragmentar al DNA por un ataque sitio-específico. Así, la producción de EROs puede provocar un daño considerable tanto para el hospedero como para el patógeno y es requerido por las células de la planta para activar una serie de mecanismos de protección (Hammond-Kosack and Jones, 1996).



Las plantas poseen sistemas muy eficientes para eliminar las especies reactivas de oxígeno y para protegerse del efecto destructivo de sus reacciones. Estas defensas no se limitan a los compartimentos intracelulares únicamente, éstas se encuentran también en el apoplasto celular.

1. Superóxido dismutasa: pertenece a la familia de las metaloenzimas, cataliza la reacción de dismutación del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) a oxígeno molecular y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ec. 1c). Así, la superóxido dismutasa remueve el  $\text{O}_2^{\cdot -}$  y disminuye el riesgo de que se forme el radical hidroxilo  $\text{HO}^{\cdot}$  (que es altamente destructivo) vía la catálisis metálica de Haber-Weiss (ec. 1i), evitando que se inicie la peroxidación de lípidos, el ataque al DNA, proteínas y otras moléculas pequeñas (Foyer *et al.* 1994).
2. Hidroperoxidasa: dos tipos de enzima entran en esta categoría a) las *peroxidadas* que reducen el peróxido de hidrógeno a expensas de varias sustancias que actúan como donadores de electrones tales como el ascorbato, las quinonas y el citocromo c y b) la *catalasa* que es una hemoproteína que contiene cuatro grupos hemo, cataliza la

descomposición del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno molecular (Murray *et al.* 1994).

3. Ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol: son antioxidantes naturales que pueden eliminar radicales hidroxilo, oxígeno singlete y anión superóxido.
4. Carotenoides: se encuentran exclusivamente en las plantas, ejercen un efecto protector contra el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) generado por reacciones fotosintéticas. Inhibe la peroxidación de lípidos eliminando los radicales hidroperoxilo de lípidos, generados durante la etapa de propagación.
5. Glutatión: previene la peroxidación de lípidos, una vez iniciado el proceso peroxidativo evita la entrada a la etapa de propagación, regenera el ascorbato y reacciona con el oxígeno singlete y el radical hidroxilo (Foyer *et al.* 1994)

### 1.5.2. Peroxidación de lípidos de membrana

La peroxidación de lípidos involucra tres distintas etapas que son: la etapa de iniciación, de propagación y de terminación. El proceso de peroxidación de lípidos se inicia por el ataque de una especie lo suficientemente reactiva para sustraer un átomo de hidrógeno de un grupo metilo de la cadena hidrocarbonada de un ácido graso insaturado (fig. 6). La remoción del hidrógeno deja al átomo de carbono (el cual fue originalmente atacado), con un electrón desapareado dando origen a un radical alquilo de lípido, éste puede tener varios destinos, pero el más probable en células aerobias es que experimente un rearrreglo molecular y en presencia de oxígeno molecular genere el radical peroxilo de lípido. Los radicales peroxilo pueden combinarse con otros radicales o pueden atacar a proteínas de membrana, también son capaces de sustraer átomos de hidrógeno de la cadena hidrocarbonada de los lípidos de membrana adyacentes, dando así origen a la propagación de reacciones en cadena de lípidos hidroperoxidados. La extensión de la etapa de propagación depende de muchos factores, entre estos está la relación lípido/proteína que hay en la membrana, la composición de los ácidos grasos, la concentración de oxígeno y la presencia de antioxidantes dentro de la membrana que interrumpen la reacción en cadena cediendo átomos de hidrógeno que sean fácilmente tomados por los radicales peroxilo presentes. La etapa de terminación se refiere a los sistemas que poseen las plantas para eliminar las especies reactivas de oxígeno y para protegerse del efecto destructivo de sus reacciones (Gutteridge and Halliwell, 1990).

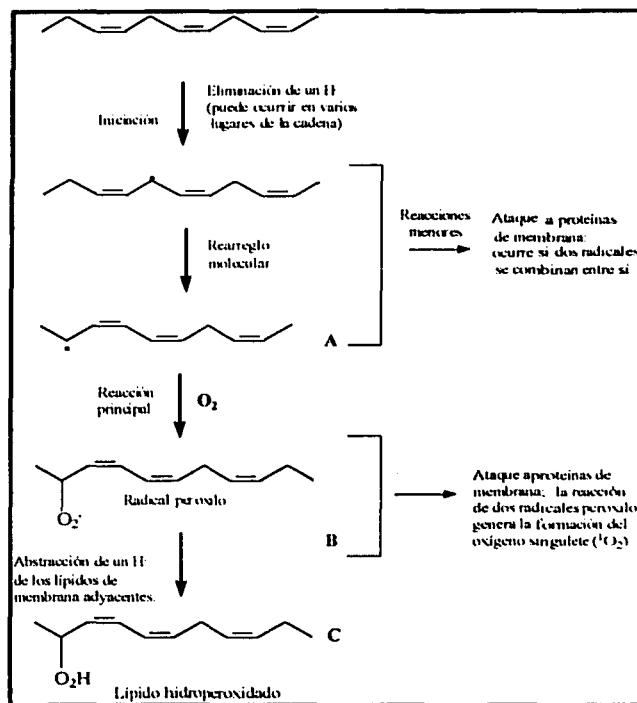


Fig. 6. Representación del mecanismo de peroxidación de lípidos. Se muestra la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso con tres dobles enlaces. A, B y C presentan en su estructura dienos conjugados los cuales absorben luz UV a una longitud de onda de 233 nm (Gutteridge and Halliwell, 1990).

### 1.5.3. Métodos de detección de lípidos peroxidados

Los lípidos peroxidados pueden ser medidos en diferentes etapas, 1) por la pérdida de ácidos grasos insaturados, 2) midiendo productos primarios de peroxidación y 3) midiendo carbonilos secundarios y gases hidrocarbonados. En la tabla III se

muestran los métodos disponibles para medir lípidos peroxidados en sistemas de membranas y fluidos biológicos (Gutteridge and Halliwell, 1990).

**Tabla III Métodos de detección de lípidos peroxidados**

<i>Método</i>	<i>Parámetros a medir</i>	<i>Observaciones</i>
Dienos conjugados	Estructuras con dienos conjugados	La oxidación de ácidos grasos insaturados es acompañada por un aumento en la absorción de luz UV a una longitud de onda entre 230 y 235 nm.
TBA (Ácido tiobarbitúrico)	Derivados de malondialdehído	El material de prueba se calienta a pH ácido con TBA, se obtiene un cromógeno rosado que es medido por su absorbancia a una longitud de onda de ~532 nm o por fluorescencia a 553 nm.
Fluorescencia	Aldehídos	Los aldehídos tales como el malondialdehído puede reaccionar con grupos amino para formar bases de Schiff (sólo a pH ácido). Los aldehídos pueden formar polímeros para producir productos fluorescentes en ausencia de grupos amino. Los productos fluorescentes formados <i>in vivo</i> son productos finales de la peroxidación de lípidos.
HPLC/Técnicas con anticuerpos	Aldehídos citotóxicos	Hidroalcanoles tales como el 4-hidroxinonenal son productos de la peroxidación de lípidos que son citotóxicos a concentraciones nanomolares y son medidos por HPLC. Los anticuerpos son usados para medir proteínas modificadas por productos de la peroxidación de lípidos.
Ciclooxigenasas	Lípidos peroxidados	La estimulación de la actividad de la ciclooxigenasa puede ser usada para medir cantidades trazas de peróxidos en fluidos biológicos. Es sensible a picomoles de peróxido.
Gases hidrocarbonados	Etano y pentano	La cromatografía de gases es utilizada para medir los gases formados durante la descomposición de lípidos peroxidados.
HPLC (High pressure liquid chromatography) y GLC (Gas liquid chromatography)	Pérdida de ácidos grasos insaturados	Es muy útil para medir lípidos peroxidados por estimulación de complejos metálicos, dando diferente distribución de productos.



## 2. ANTECEDENTES

La FB<sub>1</sub> es una micotoxina producida por *Fusarium moniliforme*, hongo patógeno que se desarrolla colonizando la semilla de algunas plantas, especialmente las gramíneas, como el maíz. Esta toxina ha sido químicamente caracterizada como agente causal de una amplia variedad de efectos toxicológicos asociados con la ingesta de maíz contaminado, y se ha demostrado que posee propiedades fitotóxicas (Van Asch *et al.* 1992). Debido a que la FB<sub>1</sub> es de naturaleza anfipática, se ha propuesto que uno de sus principales blancos de acción son las membranas celulares. En estudios realizados anteriormente, se ha reportado que la FB<sub>1</sub> puede actuar a diferentes niveles de la membrana provocando alteraciones en su estructura y función. Por ejemplo, en un ensayo *in vitro*, se reportó que la FB<sub>1</sub> disminuye la actividad de la enzima 1,3-B-glucan sintetasa (GS II) hasta en un 30 % a una concentración de 20 µM de FB<sub>1</sub>, mientras que en un ensayo *in vivo*, se vió que la FB<sub>1</sub> incrementa la actividad de la enzima GS II contenida en VMP de embriones de maíz (Garibay, 2000). Por otra parte, se reportó que la FB<sub>1</sub> inhibe aproximadamente un 23-31% la actividad de la enzima ATPasa de H<sup>+</sup> de membrana plasmática de embriones de maíz en germinación cuando la toxina se añade directamente a las VMP aisladas (*in vitro*) y un porcentaje de inhibición similar se observó cuando los embriones fueron expuestos a la FB<sub>1</sub> (*in vivo*) (Gutiérrez-Nájera, 1999). También se reportó que la FB<sub>1</sub> actúa a nivel molecular inhibiendo la enzima ceramida sintetasa, enzima clave en la biosíntesis de esfingolípidos complejos (Merrill *et al.* 1993). Ya que la FB<sub>1</sub> posee un esqueleto hidrofóbico semejante al de la esfingosina, con grupos tricarbónicos, hidroxilo y amino los cuales le confieren polaridad a la molécula, se sugiere que con estas características la FB<sub>1</sub> podría interactuar con la bicapa lipídica y con los componentes proteicos de la membrana plasmática. En estudios anteriores realizados sobre un sistema modelo de liposomas se encontró que las FB<sub>1</sub> incrementa el índice oxidativo de los lípidos de membrana, promueve la producción de radicales libres y acelera las reacciones en cadena asociadas con la peroxidación de lípidos en sistemas membranales modelo. También se encontró que la FB<sub>1</sub> altera la estructura membranal, incrementa la difusión de productos oxigenados, e incrementa la permeabilidad membranal, lo que sugiere que la FB<sub>1</sub> podría aumentar el estrés oxidativo y el daño celular (Yin *et al.* 1998).

### **3. HIPÓTESIS**

Si la FB<sub>1</sub> es capaz de perturbar la estructura membranaral e incrementar la difusión de productos oxigenados, entonces, es de esperarse que la FB<sub>1</sub> promueva la producción de radicales libres que lleven a la peroxidación de lípidos de la membrana plasmática de embriones expuestos a la toxina.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el posible daño peroxidativo que sufren los lípidos de membrana plasmática de embriones de maíz al estar en contacto con la micotoxina fumonisina B<sub>1</sub>.

#### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Aislar membranas plasmáticas y otras fracciones subcelulares de embriones de maíz germinados en presencia y ausencia de fumonisina B<sub>1</sub>.
- Medir el efecto de la FB<sub>1</sub> en la peroxidación de lípidos de membrana plasmática de embriones de maíz por las técnicas de dienos conjugados y del TBA.
- Medir el efecto de la fumonisina B<sub>1</sub> en la peroxidación de lípidos de membrana plasmática de embriones de maíz por las técnicas de separación en HPLC.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material biológico

Para el siguiente trabajo de tesis, los experimentos se realizaron utilizando embriones de maíz de la variedad Chalqueño y embriones de maíz del híbrido H-355. Para algunos experimentos controles se utilizó un homogenado de hígado de rata macho Wistar el cual fue proporcionado por el Dr. Rolando Hernández y la Biol. Lourdes Sánchez del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

### 5.2. Germinación de embriones. Imbibición de los embriones de maíz híbrido H-355 y variedad Chalqueño

El material utilizado en este ensayo (pipetas, cajas de petri con discos de papel filtro en su interior, matraces, etc.) se esterilizó a 120 °C en horno o autoclave a 121 °C y 15 lb de presión. También se esterilizó el medio de imbibición utilizado y el agua que se usó para diluirlo.

- Los embriones se transfirieron a cajas de petri a las cuales se les añadió medio de imbibición diluido con agua estéril 1:2 (v:v). En los casos donde la imbibición de los embriones se llevó a cabo en presencia de fumonisina B<sub>1</sub>, se adicionó el volumen necesario de una solución acuosa de 1mM de esta toxina para tener en el medio de imbibición una concentración final de 10 ó 20 µM según fuera el caso. La siembra de embriones se realizó bajo la flama de un mechero para evitar la contaminación con hongos o bacterias.
- Las cajas de petri con los embriones se incubaron durante 24 horas a una temperatura constante de 29 °C. Al concluir el tiempo de incubación, los embriones se congelaron con nitrógeno líquido.

#### Medio de Imbibición

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Tris-HCl	50 mM pH 7.6
Sacarosa	2,0 %
Cloramfenicol	10 µM/mL

### 5.3. Obtención de Vesículas de Membrana Plasmática (VMP)

La obtención de VMP se realizó después de la imbibición de 25-30 g de embriones por experimento, en ausencia o presencia de FB<sub>1</sub>.

- A continuación se describe el procedimiento para la obtención de la fracción de homogenado de embriones de maíz híbrido H-355 y Chalqueño. Lo único que varía en este protocolo para cada tipo de maíz es la composición del amortiguador de homogeneización. Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Sánchez-Nieto y col. (1997). Los embriones congelados con nitrógeno líquido se trituraron en mortero con pistilo, preenfriados hasta obtener un polvo fino, todo este procedimiento se llevó a cabo a una temperatura de 4 °C. El polvo de los embriones se colocó en un vaso de precipitados y se añadió amortiguador de homogeneización en una relación de 2 ml de medio por gramo de embrión. Se homogenizó con un triturador de tejido (Tissue Tearor Mod. 985-370) durante 2 minutos a velocidad de 12000 rpm; se filtró el homogeneizado a través de 4 capas de gasa previamente humedecida y el residuo se re-homogenizó con la misma proporción de tejido a medio. Por último, el filtrado de ambas homogeneizaciones se centrifugó a 3000 rpm (rotor Sorvall SS-34) 10 min. a 4 °C. Aquí se obtuvo la **fracción de homogenado**, esta fracción no contiene núcleos (H-N).
- Para obtener la fracción microsomal de embriones de maíz híbrido H-355 o Chalqueño, se eliminó la capa de lípidos que queda en la parte superior de la fracción de homogenado y se tomó con cuidado el sobrenadante. Este sobrenadante se centrifugó a 11,000 rpm (rotor Sorvall SS-34) por 10 minutos. En este paso se eliminan las mitocondrias, las cuales quedan en el botón y el sobrenadante se centrifugó nuevamente pero ahora a 45,000 rpm (rotor Beckman 60Ti) por 30 min. a 4 °C para el maíz H-355 y a 30,000 rpm (rotor Beckman 60Ti) por 1:30 min. a 4 °C para el maíz Chalqueño. El botón obtenido se resuspendió en un volumen pequeño de amortiguador de pellet. Aquí se encuentra la fracción membranaral de toda la célula (excepto las membranas de los núcleos intactos), al cual denominamos **fracción microsomal**.

Para la obtención de vesículas enriquecidas en membranas plasmáticas de embriones de maíz híbrido H-355, se siguió el procedimiento descrito por Larsson y col. (1994) el cual se describe a continuación:

A la fracción microsomal se le midió la cantidad de proteína por el método de Lowry y se calculó el volumen necesario para tener 50 mg de proteína. Esta se añadió a una mezcla de fases que se preparó un poco antes de usarse o un día antes. Una vez agregada la proteína, se ajustó el peso a 9 g con amortiguador de ajuste de peso, esto se mezcló perfectamente bien, invirtiendo el tubo de 25 a 30 veces para después centrifugar a 1500 rpm (rotor Sorvall SS-34) por 5 minutos a 4 °C. De ésta centrifugación se lograron separar dos fases donde la fase superior corresponde al PEG y se le denominó U<sub>1</sub> (constituida principalmente por las vesículas de membrana plasmática) y la fase inferior que corresponde al Dextran, se le denominó L<sub>1</sub> (constituida por otras vesículas celulares). Por último, la fracción U<sub>1</sub> se separó cuidadosamente de la fracción L<sub>1</sub> y se diluyó 1:1 con amortiguador de lavado y se centrifugó a 35,000 rpm (rotor Beckman 60Ti) por 3.5 horas a 4 °C. El sedimento obtenido se resuspendió en amortiguador de pellet (200–500 µL) y se almacenó en alícuotas de 100 µL, a –70 °C. Esta es la fracción de VMP de embriones de maíz Híbrido H-355.

Reactivos utilizados para la obtención de membranas plasmáticas de embriones de maíz Híbrido H-355.

AMORTIGUADOR	COMPOSICIÓN
De homogeneización	250 mM Sacarosa; 2 mM EDTA; 1mM ATP; 70 mM Tris/HCl pH 8.0; 100 µg/mL TPCK*; 50 µg/mL TLCK*; 4 mM DTE*; 7µg/mL Quimostatina* y 15 mM β-mercaptoetanol*.
De pellet	250 mM Sacarosa; 5 mM Tris-HCl pH 7.0; Glicerol 10% w/v.
De ajuste de peso	330 mM Sacarosa; 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.8.
De lavado	250 mM sacarosa; 10 mM Tris/HCl pH 7.5.
Mezcla de Fases óptima **	Dextran T500 6.4%; Polietilenglicol 3350 (PEG) 6.4%; 330 mM Sacarosa sólida; 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.8 y agua.

\* Se añade justo antes de utilizar la solución.

\*\* Esta mezcla se puede preparar el día anterior y guardarse hecha a 4 °C. Si se prepara el mismo día de la extracción de membranas, tener mucho cuidado de mantener la temperatura de la mezcla a 4 °C, ya que de no ser así, puede formarse una solución homogénea en lugar de ocurrir un reparto de fases.

Para la obtención de vesículas enriquecidas en membranas plasmáticas de embriones de maíz variedad Chalqueño, se siguió el procedimiento descrito por Larsson y col. (1994) modificado y que se describe a continuación:

- Se añadieron 25 mg de proteína microsomal a una mezcla de fases de 8.1 g de peso. Se añadió solución de ajuste de peso para alcanzar un peso de 10.8 g entre mezcla de fases y membranas. Después se mezcló por inversión de 20-30 veces y se centrifugó a 1.500 rpm (rotor Sorvall SS-34) por 5 minutos. Se recuperó la fase superior (fase

U1, del inglés "Upper phase 1<sup>st</sup> partition"). Si se iba a continuar enriqueciendo en membranas plasmáticas, la fase superior anterior se adicionaba a la fase de dextran de un sistema de fases de 10.8 g, en el cual se ajustó el peso con agua y no con la adición de membranas. Se volvió a centrifugar a 1,500 rpm (rotor Sorvall SS-34) por 5 minutos y se recuperó la fase superior (fase U2, del inglés "Upper phase 2<sup>nd</sup> partition"). Se pueden continuar haciendo más particiones si se desea, si no es el caso, se procede a lavar la fracción superior, diluyendo con una relación de 4 volúmenes de amortiguador de lavado por una de la fracción superior, mezclar bien y centrifugar por 1.5 h a 30,000 rpm (rotor Beckman 60Ti). El botón obtenido se resuspendió en un volumen pequeño de amortiguador de lavado y la fracción se almacenó en alicuotas a -70 °C.

Reactivos utilizados para la obtención de membranas plasmáticas de embriones de maíz variedad Chalqueño.

AMORTIGUADOR	COMPOSICIÓN
De homogeneización	50 mM HEPES/BTP pH 7.8; 250 mM Sorbitol; 1mM EDTA; 1mM KCl; 5 mM DTE y (40 µg/ml Cocktail de inhibidores de proteasas Complete marca Boehringer-Mannheimer).
De resuspensión del botón microsomal y de ajuste de peso.	500 mM Sorbitol; 5 mM Kpi pH 7.8; 0.2 mM KCl y 5 mM DTE.
De lavado	2 mM HEPES/MES pH 7.6; 350 mM Sorbitol; 1mM KCl y 1mM DTE y 40 µ/ml Cocktail de inhibidores de proteasas
Mezcla de Fases óptima *	Dextran T500 6.7%; Polietilenglicol 3350 (PEG) 6.7%; 500 mM Sorbitol; 0.2 mM KCl y 5 mM KPi pH 7.8.

\* Esta mezcla se puede preparar el día anterior y guardarse hecha a 4 °C. Si se prepara el mismo día de la extracción de membranas, tener mucho cuidado de mantener la temperatura de la mezcla a 4 °C, ya que de no ser así, puede formarse una solución homogénea en lugar de ocurrir una separación de fases.

#### 5.4. Obtención del homogenado de hígado de rata

Se usó un homogenado obtenido de hígado de rata Wistar de peso entre 230 a 280 gramos con hepatectomía parcial de 6 y 48 horas, el homogenado se obtuvo por centrifugación diferencial de acuerdo a Delfin-Aguilar y col. (1996).

### 5.5. Detección espectrofotométrica de lipoperoxidación (Método del TBA)

La lipoperoxidación se determinó por el método de Ottolenghi (1959). Se llevó a cabo el procedimiento que se indica a continuación:

- Tomar un volumen máximo de 0.6 ml de proteína y agregar amortiguador de Tris-HCl hasta un volumen total de 1.2 ml e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
- Tomar 0.4 ml del incubado y añadir: 1.5 mL de ácido acético, 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico y 0.5 mL de agua.
- Calentar la mezcla a ebullición por 45 minutos y tapar los tubos con cañicas. Los tubos se deben meter hasta que el agua esté a 92 °C.
- Pasados los 45 minutos, enfriar los tubos a chorro de agua. Añadir 1.0 mL de KCl y agitar.
- Añadir a cada uno de los tubos 5.0 mL de butanol y agitar en vortex hasta que el color se integre en la parte superior (aproximadamente 3 minutos).
- Tomar de la fracción superior 3.5 mL y centrifugar en centrifuga clínica a 7000 rpm, tomar 3 mL aproximadamente y leer a 532 nm.

Reactivos utilizados en la detección espectrofotométrica de lipoperoxidación.

Reactivo	Concentración
Acido tiobarbiturico	0.8 %
Cloruro de potasio	1.2 %
Acido acético	20.0 % pH 3.5 (ajustar pH con KOH)
Tris-HCl	150 mM pH 7.4
Butanol	Grado reactivo

### 5.6. Detección espectrofotométrica de dienos conjugados

Para la detección de dienos conjugados se utilizó el método de Recknagel y Glende (1984), el cual se describe a continuación:

- Disolver la muestra en agua destilada hasta tener un volumen de 1 ml. Agregar 4 ml de reactivo de Folch (éste sirve para la extracción de lípidos totales de la muestra).

- Agitar de 30 a 60 segundos o hasta formar una emulsión.
- Dejar reposar en hielo 30 minutos para tener la separación de fases (metanol-agua, proteína, cloroformo); si la separación no se llevó a cabo perfectamente bien, centrifugar a 6000 rpm por 5 minutos (rotor Sorvall SS-34).
- Obtener la fase inferior que corresponde al cloroformo con una pipeta pasteur y transferir 2 ml a un tubo de vidrio limpio y seco.
- Evaporar el cloroformo en un Multi-Block Heater a una temperatura entre 40–50 °C hasta secar completamente el residuo.
- Agregar al tubo seco 1.5 ml de ciclohexano puro y agitar bien, debe quedar transparente.
- Leer contra un blanco de ciclohexano puro a 233 nm.

Reactivos utilizados en la detección espectrofotométrica de dienos conjugados.

Reactivo de Folch	Cloroformo–metanol, 2:1, v/v.
Para lectura a 233 nm	Ciclohexano, grado espectrofotométrico

### 5.7. Detección por HPLC de fosfolípidos hidroxoxidados

Para la detección de los lípidos hidroxoxidados se utilizó el método de Mawatari y Murakami (1998), el cual se describe a continuación:

**Extracción de lípidos:** los lípidos fueron extraídos con cloroformo-metanol (2:1, v/v).

- Inmediatamente después de extraer las VMP se les agregó BHT (2 mg/100 mL) para evitar la oxidación por envejecimiento o manipulación.
- La muestra de membranas plasmáticas se disolvió en agua destilada hasta tener un volumen final de 1 ml. Se agregó 1 ml de metanol y 2 ml de cloroformo.
- Se agitó de 30 a 60 segundos hasta obtener una emulsión. Posteriormente, se centrifugó a velocidad máxima en una centrifuga clínica durante 5 minutos.
- Obtener la fase inferior que corresponde al cloroformo con una pipeta pasteur y transferir a un tubo de vidrio limpio y seco.
- Al remanente que contiene proteína, agua y metanol se le agrega 2 ml más de cloroformo, se agita hasta la formación de una emulsión, se centrifuga y se obtiene la fase inferior que corresponde al cloroformo con una pipeta pasteur y



se junta con el cloroformo extraído en el punto anterior. Repetir este paso una vez más para la extracción completa de los lípidos.

- El cloroformo recolectado se evapora con una corriente de nitrógeno gas (todos los solventes usados en la extracción contienen butilhidroxitolueno (BHT) a una concentración de 2 mg/ 100 ml).

#### **Separación por HPLC de fosfolípidos**

- El total de lípidos extraídos se disolvió en cloroformo-metanol (2:1, v/v). El volumen de la inyección fue de 20  $\mu$ l de muestra.
- El sistema HPLC estaba equipado con un sistema repartidor de solventes marca Waters, un desgasificador en línea, un inyector manual y un detector de UV. El sistema de procesamiento de los cromatogramas se hizo por medio de una computadora equipada con un software Millennium 32.
- La separación de los diferentes fosfolípidos del total de lípidos extraídos se logró usando una columna Bondsil NH<sub>2</sub> (150 x 4.6 mm).
- La fase móvil fue acetonitrilo/metanol/0.2% trietilamina (TEA) (67:28.5, v/v). A la solución de TEA se le ajustó el pH a 4.5 con ácido fosfórico. El flujo estimado fue de 1 ml/min. Y la temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C. Los diferentes fosfolípidos fueron detectados con luz UV a 210 nm.

**Detección de fosfolípidos hidroperoxidados.** La detección de los fosfolípidos hidroperoxidados fue monitoreada con luz UV a 234 nm con las mismas condiciones utilizadas en la separación por HPLC de fosfolípidos descrita en el párrafo anterior.

#### **5.8. Determinación de la concentración de proteína**

Se determinó la concentración de proteína de la fracción de homogenado, de la fracción microsomal y de las vesículas de membrana plasmática por el método de Lowry modificado por Peterson (1977).

Reactivo A	Mezclar en partes iguales: H <sub>2</sub> O; NaOH 0,8 N; SDS 10 %; CTC (10 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,1 % CuSO <sub>4</sub> y 0,2 % tartrato de Na o K).
Reactivo B	Mezclar un volumen del reactivo de Folin Coocaltau con 5 volúmenes de agua.

El procedimiento se indica en la siguiente tabla:

TUBO	H <sub>2</sub> O (μL)	BSA (μL)	MUESTRA (μL)	MEDIO *	NaDOC 0.15 % (mL)	REACTIVO A (mL)	REACTIVO B (mL)
1	900	-	-	-	0.1	1.0	0.5
2	900	-	-	-	0.1	1.0	0.5
3	890	10	-	-	0.1	1.0	0.5
4	880	20	-	-	0.1	1.0	0.5
5	870	30	-	-	0.1	1.0	0.5
6	860	40	-	-	0.1	1.0	0.5
7	850	50	-	-	0.1	1.0	0.5
8	840	60	-	-	0.1	1.0	0.5
9	830	70	-	-	0.1	1.0	0.5
10	820	80	-	-	0.1	1.0	0.5
11	810	90	-	-	0.1	1.0	0.5
12	800	100	-	-	0.1	1.0	0.5
13	897	-	3	-	0.1	1.0	0.5
14	897	-	3	-	0.1	1.0	0.5
15	897	-	3	-	0.1	1.0	0.5
16	897	-	-	3	0.1	1.0	0.5
17	897	-	-	3	0.1	1.0	0.5
18	897	-	-	3	0.1	1.0	0.5

**NOTAS:**

- Se debe agitar después de adicionar el NaDOC y en especial después de agregar el reactivo A.
- Después de agregar el reactivo B se debe incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Leer a 750 nm.
- Medio\*, éste es el amortiguador donde se encuentra diluida la proteína, ya sea de homogenado, microsomal o de vesículas de membrana plasmática, estos amortiguadores se indicaron anteriormente en la sección 5.3.

### 5.9. Procedimientos estadísticos utilizados en preparaciones membranales independientes

Se realizó un mínimo de tres repeticiones por experimento. A éstos datos se les determinó la media y la desviación estándar.

## 6. RESULTADOS

Para cumplir los objetivos establecidos en esta tesis, se llevaron a cabo una serie de experimentos que incluyeron el aislamiento de vesículas de membrana plasmática (VMP) de embriones de maíz en germinación. Después de esta purificación se midió el efecto producido por diferentes concentraciones de fumonisina B<sub>1</sub> en la oxidación de los lípidos de la membrana plasmática (experimentos *in vitro*). Asimismo, en otra serie de experimentos, la toxina se añadió a los embriones en germinación incluyendo su respectivo control y a partir de éstos se obtuvieron las VMP, en las que se midieron los efectos peroxidativos de la FB<sub>1</sub> (experimentos *in vivo*). Se utilizaron tres diferentes técnicas para detectar la peroxidación de lípidos de la membrana plasmática. Los procedimientos utilizados para lograr lo anterior se describieron en la sección de Materiales y Métodos.

### 6.1. EFECTO *IN VIVO* DE LA FB<sub>1</sub> EN EL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES DE EMBRIONES DE MAÍZ

Para obtener las vesículas de membrana plasmática, se embebieron 30 g de embriones de maíz en buffer de imbibición sin fumonisina B<sub>1</sub> (control) y con fumonisina B<sub>1</sub> a concentraciones de 10 y 20 µM y se incubaron durante 24 horas a 29 °C. Los rendimientos obtenidos de las extracciones de VMP de estos embriones de maíz se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Rendimiento de proteína obtenido en las diferentes fracciones subcelulares de los embriones de maíz de la variedad Chalqueño que se embebieron en ausencia y presencia de fumonisina B<sub>1</sub>.

Preparación	Homogenado (mg prot/30 g de embriones)	Microsomal (mg prot/30 g de embriones)	% de rendimiento	VMP (mg prot/30 g de embriones)	% de rendimiento
Control	5389.5	262.02 ± 0.863	100	18.96 ± 0.072	7.23
10 µM FB <sub>1</sub>	5340.6	280.59 ± 1.381	100	22.62 ± 0.115	8.06
20 µM FB <sub>1</sub>	4583.4	299.37 ± 2.55	100	18.75 ± 0.041	6.26

Como se puede observar, los resultados indican que si bien en el homogenado de los embriones embebidos con  $20 \mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$  parece haber una ligera disminución (del 15%) en la proteína obtenida con respecto al control, en la fracción microsomal hubo un pequeño aumento entre las fracciones control y las dosis de 10 y  $20 \mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$  (aumentos del 7 y 14 % respectivamente). Por el contrario, las recuperaciones de proteína en las fracciones de VMP obtenidas de embriones embebidos con y sin  $\text{FB}_1$  no mostraron cambios.

## 6.2. MEDICIÓN *IN VITRO* DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS MEMBRANALES DE EMBRIONES DE MAÍZ POR EL MÉTODO DEL TBA

Una de las técnicas más usadas en la literatura para medir lípidos peroxidados es la técnica del TBA, en la que se mide la absorbancia a 532 nm del aducto que se forma entre el producto de la peroxidación del lípido y el TBA. Para usar esta técnica en las fracciones de membrana plasmática se introdujeron primero controles positivos para cerciorarnos de que el método estaba detectando adecuadamente los productos de lipoperoxidación. Para ello, se acudió al uso de un modelo animal en el que se exacerbaba la producción de lipoperoxidos y que es un sistema de hepatectomía parcial, del que se emplearon dos fracciones de homogenado de hígado de rata. Una de ellas, H-6, fue obtenida después de 6 horas de la hepatectomía parcial; a este tiempo, los niveles de lípidos peroxidados son muy bajos, pero detectables. También contamos con la muestra H-48, que es un homogenado de hígado de rata obtenido 48 horas después de la hepatectomía parcial. En esta última muestra, los niveles de peroxidación son siempre muy elevados. En nuestras determinaciones, ambas muestras, H-6 y H-48, dieron una absorbancia de 0.0261 y 0.198 UDO/ 2 mg de proteína respectivamente (Fig. 7a), lo cual corresponde a los valores que se obtienen en un experimento típico con este modelo biológico (Delfin-Aguilar *et al.* 1996). Adicionalmente, las unidades de absorbancia obtenidas mostraron un comportamiento lineal con respecto a las cantidades de las fracciones H-6 y H-48 en un rango de absorbancia con un límite máximo de 0.203 UDO (Fig. 7b).

Fig. 7a

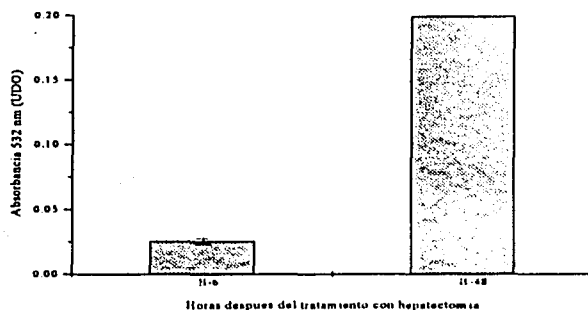


Fig. 7b

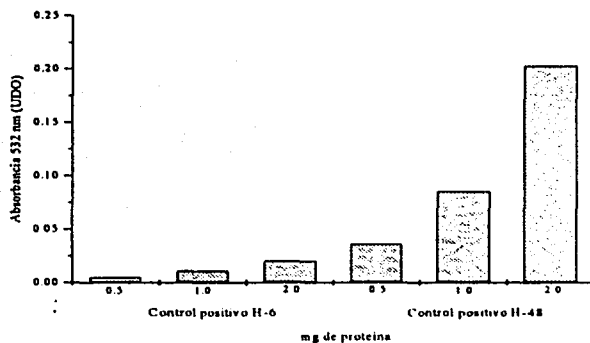


Fig. 7. Niveles de aducto de TBA-producto oxidado de lípido en muestras de homogenados de hígado de rata con hepatectomía parcial. Ratas Wistar fueron sometidas a una hepatectomía parcial y después de 6 horas (H-6) y 48 horas (H-48), el tejido fue homogenado. De este tejido, se obtuvo un homogenado, el cual se peroxidó con TBA y en el que se midieron los niveles de aducto formado en las cantidades de proteína indicadas. 7a. Niveles de aducto en las fracciones H-6 y H-48 con 2 mg de proteína. 7b. Niveles de aducto medido en las cantidades de proteína indicadas para las fracciones H-6 y H-48.

En la figura 8a se presentan los resultados obtenidos al medir la peroxidación de lípidos de VMP por el método del TBA. En este experimento se realizó la determinación utilizando 2 mg de proteína de VMP, lo cual es el doble de la cantidad de proteína utilizada para medir regularmente peroxidación de lípidos por el método de dienos conjugados como se indica en la sección 6.3. Sin embargo, la respuesta observada en las muestras de VMP fue muy pequeña, ya que los valores de absorbancia a 532 nm se encontraron en el orden de 0.005 a 0.007 UDO, y no hubo diferencias ni entre el control y las muestras con  $FB_1$ , ni entre las concentraciones de 10 y 20  $\mu M$  de  $FB_1$ . El control positivo incluido (2 mg de muestra H-6), dió una absorbancia de 0.025 UDO/ 2 mg de proteína, lo cual es consistente con el experimento de la figura anterior y también indica que comparativamente, los niveles de oxidación en los lípidos de VMP eran muy bajos. Por ello, al ver que los valores determinados eran muy pequeños utilizando 2 mg de proteína de VMP, se repitió el experimento utilizando 10 mg de proteína (Fig. 8b), esperando que la absorbancia aumentara y de haber diferencias entre los tratamientos con y sin  $FB_1$  éstas pudieran ser detectables. Sin embargo el resultado fue el mismo, ya que si bien las lecturas de absorbancia se incrementaron considerablemente dando valores en el orden de 0.063 a 0.067 UDO, al igual que en el experimento anterior, la  $FB_1$  no presentó ningún efecto comparado con el control. Considerando la posibilidad de que quizás las diferencias entre los niveles de los tratamientos fueran muy pequeñas dado que las cantidades absolutas eran de por sí muy reducidas y de que por tanto este método no era lo suficientemente sensible para medir estas diferencias de peroxidación de lípidos de VMP con y sin  $FB_1$ , además de que se requerían grandes cantidades de proteína (mayores a las que requiere el método de dienos conjugados), se desistió de seguir utilizando el procedimiento con TBA en este trabajo.

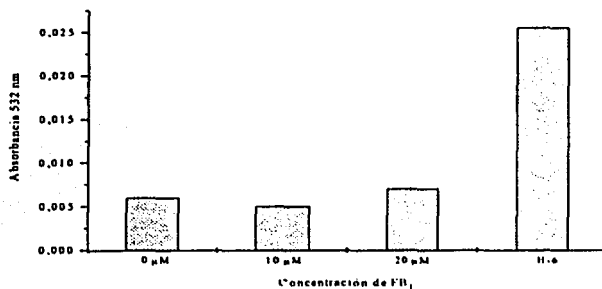


Fig. 8a. Peroxidación de lípidos de VMP de embriones de maíz de la variedad Chalqueño medida con la técnica del TBA. Se emplearon 2 mg de proteína de VMP en cada punto, la FB<sub>1</sub> se agregó a las VMP (exp. *in vitro*). Simultáneamente se emplearon 2 mg de proteína de un homogenado de hígado de rata con 6 y 48 horas de tratamiento con hepatectomía parcial como controles positivos (ver Fig. 7a y 7b).

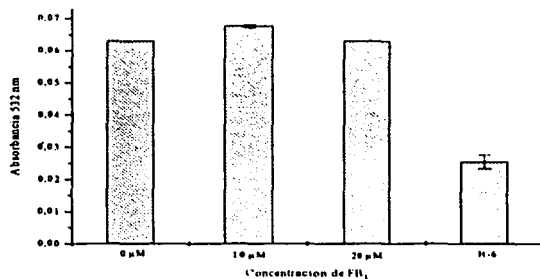


Fig. 8b. Peroxidación de lípidos de VMP de embriones de maíz de la variedad Chalqueño medida por el método del TBA. Se emplearon 10 mg de proteína de VMP en cada punto, la FB<sub>1</sub> se agregó a las VMP (exp. *in vitro*). Simultáneamente se emplearon 2 mg de proteína de un homogenado de hígado de rata con 6 y 48 horas de tratamiento con hepatectomía parcial como controles positivos (ver Fig. 7a y 7b).

### 6.3. MEDICIÓN DE PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS POR LA TÉCNICA DE DIENOS CONJUGADOS EN DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES DE EMBRIONES DE MAÍZ

Se realizaron pruebas para determinar la posible existencia de lípidos peroxidados por efecto de la  $FB_1$  en membranas tanto microsomales como plasmáticas utilizando el método de detección espectrofotométrica de dienos conjugados a 233 nm, descrito en la sección de Materiales y Métodos. Estas pruebas se realizaron utilizando tres diferentes fracciones subcelulares: homogenado, microsomas y vesículas de membrana plasmática a diferentes concentraciones de proteína como se muestra en las Figuras 9a y 9b. En estos experimentos se utilizaron dos diferentes híbridos de maíz (H-355 y Chalqueño), con el objeto de ver si podían obtenerse niveles diferentes de peroxidación lipídica.

En la figura 9 se ve que en las tres diferentes fracciones subcelulares el método presentó una relación lineal entre la absorbancia obtenida por los dienos conjugados y la cantidad de proteína utilizada en un rango que va de 0.25 a 5 mg para el maíz híbrido (Fig. 9a), y de 0.25 a 1.5 mg para el maíz Chalqueño (Fig. 9b). Al mismo tiempo, el ensayo permitió observar las diferentes respuestas que presentó cada una de las fracciones ante la adición de la  $FB_1$ . La fracción de VMP en ambos híbridos presentó una mayor absorbancia a 233 nm que las fracciones microsomal y de homogenado; por ejemplo, utilizando 1 mg de proteína obtenemos valores de absorbancia de 0.602 UDO para las VMP, 0.472 UDO para la fracción microsomal y de 0.413 UDO para la fracción de homogenado (Fig. 9b). Adicionalmente, se puede observar que no hubo grandes diferencias de la cantidad de dienos entre los dos híbridos de maíz, ya que con 1.0 mg de VMP obtenemos valores de absorbancia de 0.623 UDO y de 0.602 UDO en las Figuras 9a y 9b respectivamente. A partir de estos experimentos se pudo determinar la cantidad de proteína con la que se trabajó en los experimentos posteriores, decidiéndose trabajar con 1.0 mg de proteína por ensayo, ya que con esta cantidad de proteína la absorbancia estaba dentro de la linealidad, su magnitud quedaba razonablemente por arriba de los blancos y además, porque 1 mg es una cantidad de proteína de la que podía disponerse con relativa facilidad, dado que los rendimientos al obtener la fracción de VMP son bastante bajos.



Fig. 9a (H-355)

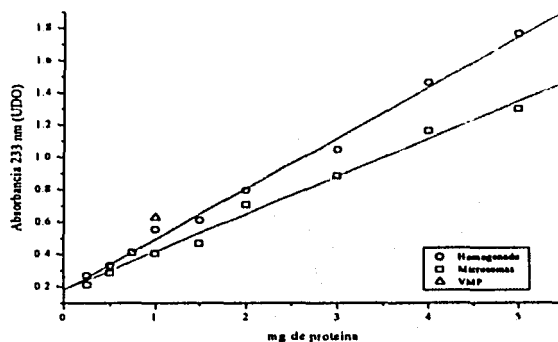


Fig.9b (Chalqueño)

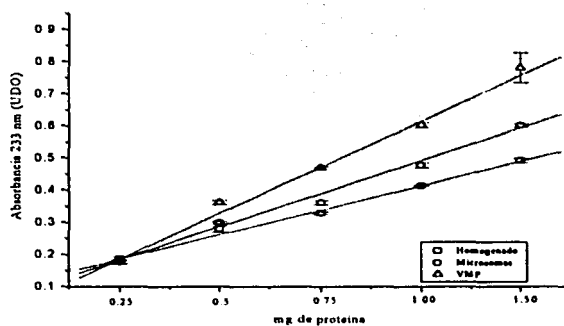


Fig. 9. Formación de dienos conjugados en diferentes fracciones subcelulares obtenidas de embriones de maíz híbrido H-355 (Fig. 9a) y variedad Chalqueño (Fig 9b) embebidos durante 24 horas. Se obtuvieron las diferentes fracciones y posteriormente se midió la formación de dienos conjugados como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se utilizaron las cantidades de 1 mg de proteína de vesículas de membrana plasmática y 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg de proteína de la fracción de homogenado y microsomal para el maíz híbrido y 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 mg para el maíz Chalqueño.

### 6.3.1 Efecto *in vitro* de la FB<sub>1</sub> en la peroxidación de lípidos membranales

Habiendo establecido las condiciones para medir adecuadamente los niveles de dienos conjugados en fracciones subcelulares de embriones de maíz no expuestos a la FB<sub>1</sub>, se midió entonces la formación de dienos conjugados a 233 nm por efecto de la fumonisina B<sub>1</sub> en 1 mg de proteína de la fracción microsomal (Fig. 10a) y posteriormente se midió el mismo efecto utilizando proteína de la fracción de vesículas de membrana plasmática (Fig. 10b), utilizando maíz Chalqueño. Hay que hacer notar que la toxina fue añadida directamente a las membranas aisladas (efecto de la FB<sub>1</sub> *in vitro*). En las figuras 10a y 10b se observa que efectivamente 1 mg de proteína de cualquiera de las dos fracciones dió adecuadas lecturas de absorbancia, si bien no se vió efecto de la fumonisina B<sub>1</sub> ni en los microsomas ni en las VMP, con ninguna de las dos concentraciones de la toxina. Este resultado es muy claro considerando las pequeñas desviaciones estándar obtenidas.

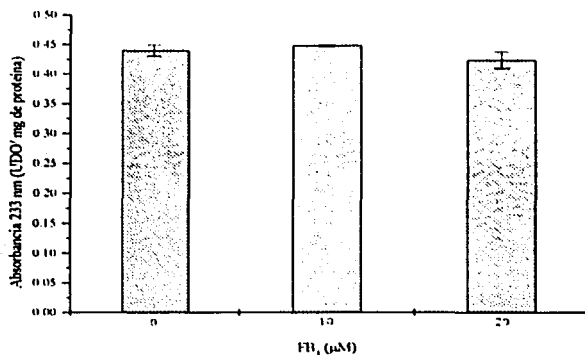


Fig. 10a. Formación de dienos conjugados por efecto de la FB<sub>1</sub> en microsomas de embriones de maíz Chalqueño. Los embriones se embebieron en ausencia de FB<sub>1</sub>, posteriormente se obtuvieron los microsomas como se indica en Materiales y Métodos. Se utilizó 1 mg de proteína microsomal en cada punto, la FB<sub>1</sub> se agregó directamente a los microsomas. El experimento se realizó por triplicado.

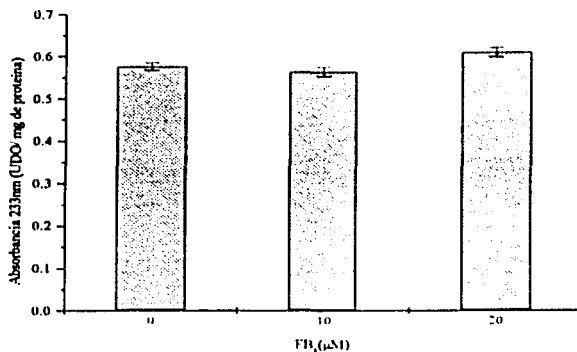


Fig. 10b. Formación de dienos conjugados por efecto de la FB<sub>1</sub> en VMP de embriones de maíz de la variedad Chalqueño. Los embriones se embebieron en ausencia de FB<sub>1</sub>, posteriormente se obtuvieron las VMP como se indica en Materiales y Métodos. Se utilizó 1 mg de proteína de VMP en cada punto, la FB<sub>1</sub> se agregó directamente a las VMP. El experimento se realizó por triplicado.

Una vez que no se encontró ningún efecto de la FB<sub>1</sub> ni en microsomas, ni en VMP del maíz Chalqueño, se hizo un ensayo semejante con microsomas del híbrido H-355, pero preincubando con la toxina por diferentes tiempos, para ver si este tratamiento evidenciaba un efecto de la FB<sub>1</sub> sobre la peroxidación de lípidos membranales (Fig. 11). En la Fig. 11 se puede observar que cuando se agregó la FB<sub>1</sub> directamente a los microsomas no se produjo ningún efecto en la formación de dienos conjugados comparado con el control en ninguna de las concentraciones utilizadas de FB<sub>1</sub>, lo mismo sucedió cuando los microsomas se incubaron con la toxina a los tiempos de 10, 20 y 40 minutos (no se muestran estos resultados).

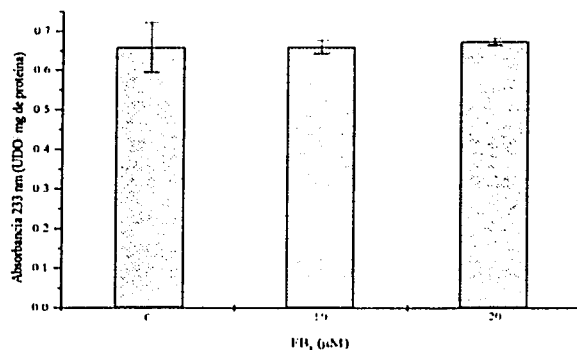


Fig. 11. Formación de dienos conjugados por efecto de la FB<sub>1</sub> en la fracción microsomal de embriones de maíz híbrido H-355. Los embriones se embebieron en ausencia de FB<sub>1</sub>, posteriormente se obtuvieron los microsomas como se indica en Materiales y Métodos. La FB<sub>1</sub> se agregó directamente a los microsomas. El experimento se realizó por triplicado.

Posteriormente se utilizó solo el maíz Chalqueño y en éste se realizó una serie de tres experimentos *in vitro* utilizando la fracción de VMP a la que se le agregó la toxina FB<sub>1</sub> en las condiciones siguientes: sin pre-incubación e incubando 10 y 30 minutos, para ver si podía exacerbarse un posible efecto de la FB<sub>1</sub> aumentando el tiempo de exposición de las membranas con la toxina (Fig. 12a,b,c).

En las tres gráficas, se puede observar que cuando las membranas se preincubaban con la FB<sub>1</sub> 10 ó 30 minutos no se produce ningún cambio en los niveles de dienos conjugados, ya que no se observan diferencias de absorbancia entre el control y las dos diferentes concentraciones de FB<sub>1</sub> utilizadas, o bien las diferencias son pequeñas. Tampoco se observan aumentos de absorbancia entre los diferentes tiempos de preincubación con o sin la toxina. Por ello, se puede concluir que no hay un efecto importante de la FB<sub>1</sub> sobre la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática en condiciones *in vitro*.

Fig. 12a (0 min. de pre-incubación)

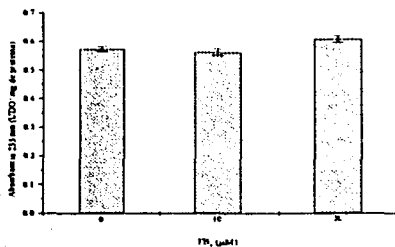


Fig. 12b (10 min. de pre-incubación)

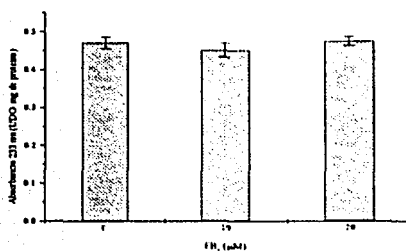


Fig. 12c (30 min. de pre-incubación)

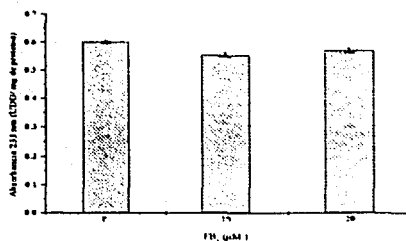
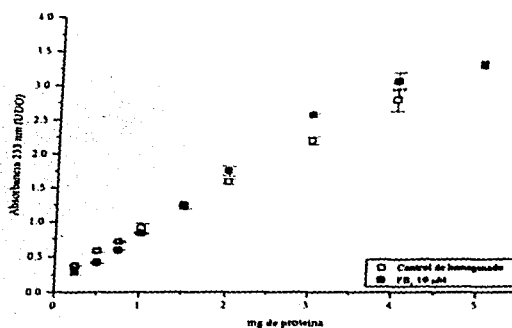


Fig. 12. Efecto del tiempo de pre-incubación de la FB<sub>1</sub> con VMP en la formación de dienos conjugados. Se utilizaron VMP de embriones de maíz de la variedad Chalqueño. Los embriones se embebieron en ausencia de FB<sub>1</sub>. La fumonisina B<sub>1</sub> se agregó a las VMP y se incubaron durante 0 (Fig. 12a), 10 (Fig. 12b) y 30 minutos (Fig. 12c) respectivamente.

### 6.3.2 Efecto *in vivo* de la fumonisina B<sub>1</sub> en la peroxidación de lípidos membranales

Debido a que las fracciones de homogenado y microsomas son mucho más fáciles de obtener y con mejores rendimientos en proteína como se indicó en la Tabla IV, se realizó con ellas una serie de experimentos que nos permitieran conocer el efecto de la FB<sub>1</sub> en el comportamiento de ambas fracciones en cuanto a la formación de dienos conjugados, cuando los embriones se embebieron en ausencia y presencia de 10  $\mu$ M de fumonisina B<sub>1</sub>, es decir en condiciones *in vivo* de adición de la FB<sub>1</sub>. En la Fig. 13a puede notarse que la adición *in vivo* de la FB<sub>1</sub> a los embriones produjo formación de dienos conjugados en el homogenado pero en valores muy cercanos a los del control, ya que los valores de desviación estándar no se superpusieron. Esta misma gráfica muestra que cantidades mayores de proteína produjeron lecturas proporcionales a 233 nm en un rango lineal entre 0.25 y 5 mg de proteína. La Fig. 13b muestra un patrón muy semejante al de los homogenados: a) diferencias pequeñas entre microsomas de embriones embebidos con FB<sub>1</sub> comparada con las de embriones control. b) presenta una tendencia lineal en la absorbancia a 233 nm en respuesta a incrementos de proteína microsomal, c) valores altos de absorbancia aún a concentraciones bajas de proteína como de 1 mg, d) gran reproducibilidad en los valores y una muy baja desviación estándar.

Fig. 13a



### 6.3.2 Efecto *in vivo* de la fumonisina B<sub>1</sub> en la peroxidación de lípidos membranales

Debido a que las fracciones de homogenado y microsomas son mucho más fáciles de obtener y con mejores rendimientos en proteína como se indicó en la Tabla IV, se realizó con ellas una serie de experimentos que nos permitieran conocer el efecto de la FB<sub>1</sub> en el comportamiento de ambas fracciones en cuanto a la formación de dienos conjugados, cuando los embriones se embebieron en ausencia y presencia de 10  $\mu$ M de fumonisina B<sub>1</sub>, es decir en condiciones *in vivo* de adición de la FB<sub>1</sub>. En la Fig. 13a puede notarse que la adición *in vivo* de la FB<sub>1</sub> a los embriones produjo formación de dienos conjugados en el homogenado pero en valores muy cercanos a los del control, ya que los valores de desviación estándar no se superpusieron. Esta misma gráfica muestra que cantidades mayores de proteína produjeron lecturas proporcionales a 233 nm en un rango lineal entre 0.25 y 5 mg de proteína. La Fig. 13b muestra un patrón muy semejante al de los homogenados: a) diferencias pequeñas entre microsomas de embriones embebidos con FB<sub>1</sub> comparada con las de embriones control. b) presenta una tendencia lineal en la absorbancia a 233 nm en respuesta a incrementos de proteína microsomal, c) valores altos de absorbancia aún a concentraciones bajas de proteína como de 1 mg, d) gran reproducibilidad en los valores y una muy baja desviación estándar.

Fig. 13a

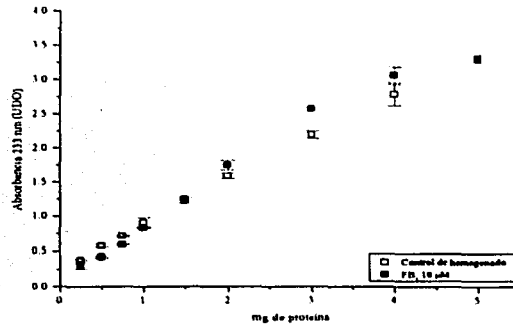


Fig. 13b

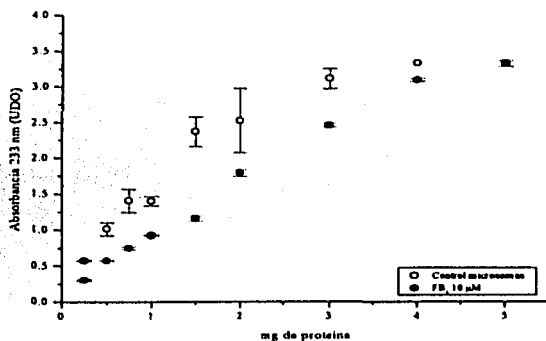


Fig. 13. Formación de dienos conjugados en la fracción de homogenado y en la fracción microsomal por efecto de la adición *in vivo* de la FB<sub>1</sub> de embriones de maíz de la variedad Chalqueño. Los embriones se embebieron en ausencia y presencia de 10 µM de FB<sub>1</sub> durante 24 horas. 13a. Perfil del homogenado. 13b. Perfil de la fracción microsomal. Se realizaron tres experimentos independientes utilizando 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg de proteína de ambas fracciones.

Una vez que se estableció el método y la cantidad de membranas a utilizar expresados en términos de proteína membranar, se procedió a determinar el efecto de otras concentraciones de FB<sub>1</sub> añadida en condiciones *in vivo*. Para ello, primero se realizó una serie de cuatro experimentos, cada uno por triplicado, con microsomas obtenidos de embriones de maíz expuestos a dos concentraciones de FB<sub>1</sub> (Fig. 14). Ya que la FB<sub>1</sub> es una molécula anfipática y puede inhibir a la enzima ceramida sintetas que se localiza en el retículo endoplásmico, consideramos que la FB<sub>1</sub> podría internalizarse en éstas y otras endomembranas incluídas en la fracción microsomal y en donde también podría tener un efecto peroxidativo de sus lípidos.



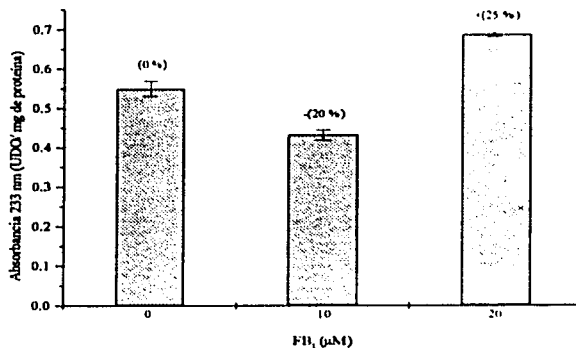


Fig. 14. Formación de dienos conjugados por efecto de la fumonisina B<sub>1</sub> en la fracción microsomal de embriones de maíz de la variedad Chalqueño. Los embriones se embebieron durante 24 horas en ausencia de FB<sub>1</sub> (control) y en presencia de 10 y 20 μM de FB<sub>1</sub>.

En la Figura 14 se muestra el efecto que tuvo la fumonisina B<sub>1</sub> en la formación de dienos conjugados de la fracción microsomal. Como se puede ver, cuando los embriones se incubaron con 10 μM de FB<sub>1</sub>, la formación de dienos conjugados se vió disminuída con respecto al control y presentó un valor de absorbancia de 0.430 UDO (20 % menor que el control), por otra parte, cuando los embriones fueron embebidos con 20 μM de FB<sub>1</sub>, la formación de dienos conjugados se incrementó 25 % con respecto al control, presentando una absorbancia de 0.685 UDO, mientras que el control presentó una absorbancia de 0.549 UDO. El incremento también se observó con respecto a la muestra con 10 μM de FB<sub>1</sub>. Este patrón de respuesta a la FB<sub>1</sub> se repitió consistentemente en cuatro experimentos hechos por triplicado cada uno y a partir de diferentes preparaciones membranales. Hay que hacer notar la pequeña desviación estándar que muestran las mediciones.

También se realizó una serie de experimentos de adición de la FB<sub>1</sub> *in vivo* a los embriones y luego midiendo los dienos conjugados de las vesículas de membranas

plasmáticas correspondientes y que se presentan en la Figura 15a. Es posible observar que en VMP el efecto de la adición *in vivo* de la  $FB_1$  fue diferente cuantitativamente al observado en microsomas, ya que, si bien  $10 \mu M$  de  $FB_1$  también disminuyó el nivel de dienos conjugados con respecto al control, esta inhibición fue mayor, 41 %, que la que  $10 \mu M$  de  $FB_1$  ejerció en microsomas (20 %). Por otra parte, la concentración de  $20 \mu M$  de  $FB_1$  que había aumentado 25 % los niveles de dienos conjugados en los microsomas, en VMP tuvo un ligero efecto inhibitorio del 13 % comparado con el control.

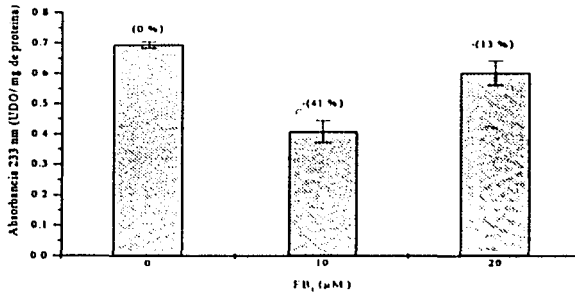


Fig. 15a. Formación de dienos conjugados por efecto de la  $FB_1$  *in vivo* en VMP de embriones de maíz de la variedad Chalqueño. Los embriones se embebieron durante 24 horas en ausencia (control) de  $FB_1$  y presencia de 10 y 20  $\mu M$  de  $FB_1$ . La figura representa a cuatro experimentos, cada uno por triplicado y de diferentes preparaciones de VMP.

Con objeto de ver si la luz promovía un aumento en los niveles de dienos conjugados, como se ha reportado en plántulas enteras de *Arabidopsis thaliana* (Stone *et al.* 2000. ), se realizó un experimento *in vivo* en donde los embriones se embebieron durante 24 horas en presencia de luz (Fig. 15b) y en ausencia de  $FB_1$  (control), y presencia de 5 y 10  $\mu M$  de  $FB_1$ . En la Figura 15b se puede ver que cuando las VMP se incubaron en presencia de luz, el efecto que produjo la  $FB_1$  a concentraciones de 5 y 10  $\mu M$  fué el mismo que en ausencia de luz, ya que se observó que a estas dos concentraciones de  $FB_1$  la formación de dienos conjugados se vió disminuída con respecto al control en un 40 %.

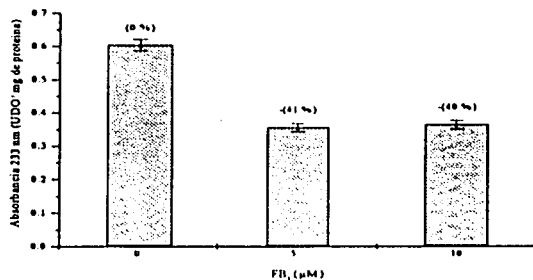


Fig. 15b. Formación de dienos conjugados por efecto de la luz y de la FB<sub>1</sub> *in vivo* en VMP de embriones de maíz de la variedad Chalqueño. Los embriones se embebieron durante 24 horas con luz, en ausencia (control) de FB<sub>1</sub> y presencia de 5 y 10 μM de FB<sub>1</sub>.

Todos los resultados de dienos conjugados que se han mostrado en las figuras anteriores, han sido expresados en función de la cantidad de proteína de membrana plasmática añadida. Sin embargo, ya que el método sólo mide dienos conjugados formados a partir de la peroxidación de la fracción lipídica, es conveniente también expresar los resultados de niveles de dienos conjugados en términos de contenido de ácidos grasos. Por ello, a partir de las Figuras 12c (exp. *in vitro*) y 15a (exp. *in vivo*) se re-calcularon los niveles de dienos conjugados formados en VMP y se expresaron por mg de ácido graso (Tabla V).

Como se puede observar en la Tabla V, los resultados indican que si bien se pudo apreciar una ligera disminución en los niveles de dienos conjugados cuando los resultados se expresaron por mg de proteína de membrana plasmática tanto *in vitro* como *in vivo* (Fig. 15a), no ocurrió así cuando se expresaron por mg de ácido graso. En esta última situación, cuando las membranas plasmáticas puras estuvieron expuestas a concentraciones de 10 y 20 μM de FB<sub>1</sub> (experimentos *in vitro*), la formación de dienos conjugados disminuyó un 8 y 5 % respectivamente con respecto al control y por ello, no hubo diferencia entre los valores expresados por mg de proteína y por mg de ácido graso. Sin embargo, en experimentos *in vivo*, en los que los embriones fueron expuestos

a 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$  hubo una disminución del 17 % con respecto al control, semejante a lo que se observó *in vitro*, mientras que con 20  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  hubo un aumento del 22 % con respecto al control, contrariamente a lo que se observó en el experimento *in vitro* (Fig. 12c). Esto es importante puesto que nos está indicando que una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$  es suficiente para inducir peroxidación de lípidos membranales.

Tabla V. Niveles de dienos conjugados en membranas plasmáticas de embriones de maíz embebidos en ausencia y presencia de  $\text{FB}_1$  expresados por mg de proteína y por mg de ácido graso.

Tratamiento	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
	Abs 233 UDO/mg prot. (%)	Abs 233 UDO/mg de ac. graso* (%)	Abs 233 UDO/mg prot. (%)	Abs 233 UDO/mg de ac. graso* (%)
Control	0.6025 (0)	0.7503 (0)	0.6943 (0)	0.8646 (0)
10 $\mu\text{M}$ $\text{FB}_1$	0.5563 (-8)	0.6928 (-8)	0.4074 (-41)	0.7172 (-17)
20 $\mu\text{M}$ $\text{FB}_1$	0.5719 (-5)	0.7122 (-5)	0.6012 (-13)	1.0583 (+22)

\*Para expresar los resultados por mg de ácidos grasos, se consideraron los valores de 803  $\mu\text{g}$  de ác. graso/mg de proteína en la fracción de VMP control y el de 568  $\mu\text{g}$  de ác. graso/mg de proteína en las fracciones de VMP obtenidas de embriones de maíz expuestos a la  $\text{FB}_1$  (Gutiérrez-Nájera 2002).

#### 6.4. EFECTO *IN VIVO* DE LA FUMONISINA B<sub>1</sub> EN LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DETERMINADA POR HPLC

Con objeto de determinar la peroxidación de lípidos membranales, se procedió inicialmente a establecer el perfil de los principales ácidos grasos presentes en la VMP (Fig. 16). Estos resultados se presentan en la Tabla VI. En donde se pueden identificar las especies A, C, D y E como ácidos grasos que disminuyen en presencia de  $\text{FB}_1$ .

Fig.16. Cromatograma del perfil de los fosfolípidos más abundantes en VMP de embriones de maíz embebidos sin  $FB_1$ . Los fosfolípidos se extrajeron, separaron y detectaron por HPLC y luz UV a 210 nm como se indicó en Materiales y Métodos.

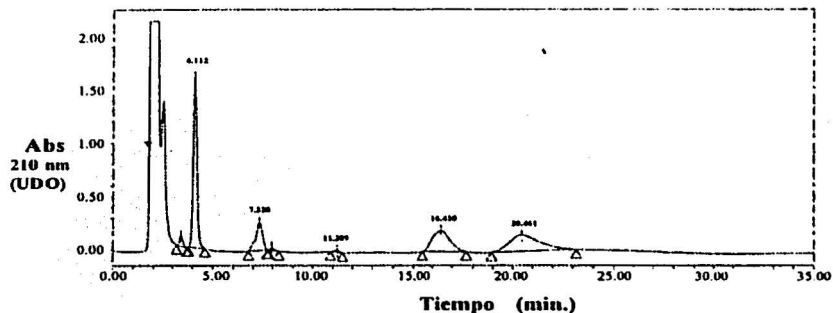


Tabla VI. Determinación del perfil de los fosfolípidos más abundantes en VMP de embriones de maíz embebidos sin y con  $20 \mu M$  de  $FB_1$ . Los fosfolípidos se extrajeron, separaron y detectaron por HPLC y luz UV a 210 nm como se indicó en Materiales y Métodos. Los picos se compararon de acuerdo al tiempo de retención correspondiente (TR).

Especie	TR (min)	Área (%)	
		- $FB_1$	+ $FB_1$
A	4.112	344,802,144 (0)	189,501,531 (-45)
B	7.328	107,292,753 (0)	106,621,408 (-1)
C	11.209	4,856,652 (0)	4,000,153 (-18)
D	16.438	200,403,924 (0)	112,256,826 (-44)
E	20.461	274,126,923 (0)	222,134,460 (-19)

Se utilizó la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar los niveles de lípidos peroxidados por efecto de la  $FB_1$ . Las condiciones cromatográficas por HPLC para la identificación de lípidos peroxidados se describieron en la sección de Materiales y Métodos.

La tabla VII, muestra los resultados obtenidos por HPLC para detectar y medir los lípidos peroxidados a 234 nm. Los lípidos membranales provienen de embriones embebidos en ausencia y presencia de 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$ . Los valores que se presentan corresponden a las áreas de los picos obtenidos en el cromatograma y, representan los niveles de ácidos grasos peroxidados para las muestras control y con 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$ . Como nivel de peroxidación basal se tomaron los valores de ácidos grasos peroxidados de las muestras sin  $\text{FB}_1$  (control). Las especies A, B, C, D y E son las diferentes especies de lípidos de membrana más representativas y están presentes en las muestras con y sin  $\text{FB}_1$ . Por ello, la suma de estas especies de ácidos grasos representa el porcentaje total de peroxidación de los ácidos grasos en las muestras de membrana plasmática.

Tabla VII. Detección por HPLC a 234 nm de los niveles de ácidos grasos peroxidados de embriones de maíz embebidos en ausencia y presencia de 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$ . Los valores de las áreas están expresados por mg de ácido graso.

Especie	TR (min)	Área (unidades arbitrarias) (%)	
		- $\text{FB}_1$	+ $\text{FB}_1$
A	4.129	6,315,169	5,442,358
B	7.627	544,142	2,371,740
<b>A+B</b>		<b>6,859,311 (0 %)</b>	<b>7,814,098 (14 %)</b>
C	11.187	555,265	386,374
D	16.610	2,843,055	3,223,437
E	21.514	17,192,134	21,757,157
<b>A+B+C+D+E</b>		<b>27,449,765 (0 %)</b>	<b>33,181,066 (21 %)</b>

En los resultados que se muestran, cada especie designada por una letra corresponde a un tipo diferente de ácido graso insaturado y cada uno puede sufrir diferente grado de peroxidación, ya sea en presencia o en ausencia de  $\text{FB}_1$ . Por ejemplo, la especie A en la muestra sin  $\text{FB}_1$  (control) sufrió mayor peroxidación que cuando la muestra estuvo en contacto con 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$ , contrariamente a lo que se observa con la especie B donde el mayor grado de peroxidación estuvo en la muestra tratada con  $\text{FB}_1$ . Haciendo la suma de los valores de área de A+B se tiene que en esas especies las muestras expuestas a la  $\text{FB}_1$  si presentaron mayor peroxidación (14 %) que las muestras control. De la misma

manera, se hizo el análisis para las especies C, D, E de la misma muestra y se sumaron las áreas de las cinco diferentes especies de ácidos grasos presentados en la Tabla VI, resultando que, efectivamente, los componentes de las muestras expuestas a 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$  si presentaron mayor peroxidación, 21 % más que las muestras sin  $\text{FB}_1$ . Estos resultados son muy importantes porque concuerdan con los resultados obtenidos con la técnica de dienos conjugados, en los que los ácidos grasos de membrana plasmática de embriones expuestos a 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$  presentaron un 22 % más de peroxidación que los ácidos grasos totales de las membranas control. Con los resultados anteriores se tiene evidencia de que la  $\text{FB}_1$  sí incrementa los niveles de peroxidación de lípidos membranales en condiciones *in vivo* medidos con dos técnicas diferentes.

## 7. DISCUSIÓN

La variedad de moléculas que despliega un patógeno para tener una invasión exitosa sobre el hospedero es muy amplia y depende de la naturaleza del patógeno y del hospedero mismo. A su vez el hospedero puede tener la capacidad de resistir la invasión del patógeno y para ello también cuenta con una gama de mecanismos de respuesta contra el patógeno. Sin embargo, aunque están descritas muchas estrategias de defensa que involucran la producción de moléculas específicas, los mecanismos que las generan están conformados por vías con muchas reacciones intermediarias, las cuales en su mayor parte son desconocidas (Blumwald *et al.* 1998, Scheel 1998).

Por otra parte, los procesos celulares del hospedero que son desencadenados por la acción de las moléculas secretadas por el patógeno, tampoco están bien descritos. Un sitio de acceso a la célula del hospedero es su membrana plasmática. La interacción de esta barrera con productos secundarios del patógeno como son las toxinas ha sido descrita en algunos casos, como en las toxinas de *Cercospora beticola* (Blein *et al.* 1988, Simon-Plas *et al.* 1996), de *Alternaria alternata* (Thuleau *et al.* 1988), de *Pseudomonas syringae* (Suzuki *et al.* 1992), de *Pseudomonas fuscovaginac* (Batoko *et al.* 1998) y de *Fusicoccum amygdalis* (Roberts and Boules, 1999).

Los mecanismos de acción de estas toxinas en la membrana son diversos y dependen fundamentalmente de la estructura química de la toxina (Isaac 1991), por ello, algunas de las toxinas actúan sobre algún componente proteico de la membrana, mientras que otras sobre la fase lipídica de la misma. En este último caso, está la toxina fungal beticolina, la cual se agrega para formar estructuras que formarán un poro a través de la membrana (Goudet *et al.* 1998). En el caso de la toxina FB<sub>1</sub>, su naturaleza anfipática incluye la posibilidad de que interaccione directamente con la parte lipídica de la membrana, pero la posibilidad de que actúe sobre componentes proteicos de la membrana no puede excluirse. La acción de la FB<sub>1</sub> en liposomas ha demostrado que ésta es capaz de interaccionar con la bicapa lipídica gracias a sus características anfipáticas (Yin *et al.* 1996a, Yin *et al.* 1996b, Yin *et al.* 1998). Específicamente, son dos los efectos que produce la FB<sub>1</sub> en los liposomas: uno es el de modificar la fluidez de la bicapa debido al intercalamiento membranar de la toxina (Yin *et al.* 1996b), y el otro



es su efecto inductor de la peroxidación de lípidos membranales. Este último se ha explicado por un efecto perturbador de la estructura de la bicapa del liposoma por la  $FB_1$ , lo cual genera sitios de "descompactación" de la lámina lipídica por donde puede difundir el oxígeno y sus radicales libres, los cuales a su vez pueden allegarse a sitios de insaturación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos de los liposomas, generando con ello, los correspondientes productos de lipoperoxidación. En sistemas vivos se ha demostrado que la  $FB_1$  induce de manera importante la formación de MDA, un subproducto de la peroxidación lipídica membranal en células de riñón de mono (Abado-Becognee *et al.* 1998). En sistemas vegetales, la  $FB_1$  aplicada a plántulas de *Arabidopsis thaliana* produjo la formación de especies reactivas de oxígeno detectada por la formación en la periferia de lesiones necróticas con azul de tetrazolio (Stone *et al.* 2000). Estos últimos datos fueron muy cualitativos, y no incluyeron tampoco información sobre la participación de las especies reactivas de oxígeno en procesos oxidativos de la membrana plasmática.

El objetivo de este trabajo de tesis fue el de determinar si había peroxidación de lípidos de membrana plasmática por acción de la  $FB_1$ . Por ello, se usaron varias técnicas para medir los lípidos peroxidados cuando la  $FB_1$  fue añadida tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*.

Una de las condiciones iniciales importantes de satisfacer en el sistema experimental que se usó, era el establecimiento de los rendimientos de proteína en las diferentes fracciones subcelulares que fueron estudiadas, ya que inicialmente todas las cantidades utilizadas en la extracción de las fases lipídicas se calcularon en función de la proteína de la fracción correspondiente. Los resultados obtenidos a éste respecto indican que el rendimiento de proteína en las diferentes fracciones subcelulares no varió entre los embriones totales con y sin  $FB_1$ . Esto es importante, pues implica que la toxina no tiene un efecto en las cantidades de proteína presente en los embriones, a diferencia de lo que se ha visto en células de riñón de mono, en donde concentraciones tan bajas de  $FB_1$  como  $14 \mu M$  produjeron un 23 % de inhibición en la síntesis de DNA y de proteína (Abado-Becognee *et al.* 1998). Esta diferencia entre la respuesta del tejido vegetal y el de riñón puede deberse a que éste último ha demostrado ser el sistema modelo más sensible a los efectos de la  $FB_1$  (Abado-Becognee *et al.* 1998). Además, nuestros

resultados indican que la imbibición con 10 y 20  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  no hicieron ninguna diferencia en cuanto a la cantidad de vesículas de membrana plasmática que se obtuvieron, medida en términos de proteína. Esto indica que si bien la  $\text{FB}_1$  puede intercalarse en las membranas, no induce un cambio que pueda alterar las propiedades que determinan el comportamiento de las vesículas durante el procedimiento de purificación por el sistema de partición de fases en dos polímeros acuosos. Este hecho garantiza que las fracciones membranales obtenidas de los embriones expuestos o no a la  $\text{FB}_1$  sean comparables.

El método de detección de productos de peroxidación de lípidos por formación de los aductos respectivos con el TBA fue estandarizado con dos fracciones de homogenado de hígados de rata hepatectomizados. Este es un modelo en el que se expresa una gran producción de lípidos peroxidados. En nuestras condiciones de extracción y detección, las muestras de hígado también tuvieron muy buenos resultados en términos de sensibilidad del método; desgraciadamente, en nuestras muestras de embriones de maíz, si bien hubo una detección adecuada del aducto en las muestras expuestas o no con  $\text{FB}_1$ , las diferencias entre ellas fueron muy pequeñas, si es que las hubo, debido a que los registros de absorbancia a 532 nm fueron muy bajos. Estos resultados contrastan nuevamente con los obtenidos en células de mono en cultivo, en donde la concentración de 14  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$  aumentó 8 veces la cantidad del aducto con respecto al control (Abado-Becognee *et al.* 1998). Esta discordancia puede deberse nuevamente a que estos autores usaron un sistema biológico extremadamente sensible a los efectos de la  $\text{FB}_1$  por un lado y por otro, a que su detección del aducto fue hecha también de manera más sensible y precisa por un sistema de detección de fluorescencia en HPLC. Con objeto de disponer de una técnica que permitiera detectar posibles diferencias pequeñas, se resolvió probar la técnica de detección de dienos conjugados como productos de peroxidación lipídica.

Para la estandarización de la técnica de dienos conjugados se utilizaron tres diferentes fracciones subcelulares: homogenado, microsomas y vesículas de membrana plasmática con diferentes concentraciones de proteína. Los resultados que se obtuvieron indicaron que las vesículas de membrana plasmática son la fracción capaz de sufrir mayor grado de lipoperoxidación, esto se debe a que en esta fracción de VMP la

relación proteína:lípido es menor, o sea, que 1 mg de proteína está más enriquecida de lípidos, pues las membranas se encuentran puras y por lo tanto hay mayor cantidad de lípidos de membrana plasmática por mg de proteína que pueden sufrir peroxidación, de ahí que 1 mg de proteína de VMP contenga una mayor cantidad de lípidos susceptibles de ser peroxidados, mientras que 1 mg de proteína ya sea de microsomas o de homogenado, que contiene una mayor relación proteína:lípido, debido a que tienen menor cantidad de VMP, y por lo tanto menor cantidad de lípidos de membrana plasmática, experimentan menor peroxidación. En experimentos posteriores se trabajó con VMP y con microsomas, ya que esta fracción a pesar de que contiene poca cantidad de membranas plasmáticas, incluye a las diferentes fracciones membranales de los diferentes organelos celulares (a excepción de las membranas nucleares y mitocondriales), y que son sitios potenciales de alojamiento de la FB<sub>1</sub>.

Se realizaron experimentos *in vitro* con el objeto de conocer el efecto que producía la FB<sub>1</sub> cuando se añadía directamente a las membranas plasmáticas y microsomales. Los resultados obtenidos indicaron que si bien la FB<sub>1</sub> producía un efecto de lipoperoxidación tanto en microsomas como en membranas plasmáticas, éste era muy pequeño, puesto que no se observaron diferencias en los niveles de dienos conjugados formados entre las muestras control y las que contenían FB<sub>1</sub>. Posteriormente se realizaron experimentos donde las muestras control y con FB<sub>1</sub> se preincubaron a diferentes tiempos y donde los resultados que se obtuvieron nos indicaron que la FB<sub>1</sub> producía una muy ligera disminución (5-8 %) en los niveles de dienos conjugados con o sin preincubación, ya que no se observaron diferencias significativas en la absorbancia entre el control y las muestras con FB<sub>1</sub> y si las hubo, éstas eran muy pequeñas. Con todo esto, se puede concluir que la FB<sub>1</sub> no produce un efecto importante en la peroxidación de lípidos de membrana plasmática en condiciones *in vitro*, contrario a lo que se ha visto en liposomas, donde la FB<sub>1</sub> incrementa de forma muy importante el índice oxidativo de lípidos membranales. Estas diferencias pueden explicarse porque los resultados con liposomas se obtuvieron utilizando técnicas de resonancia de spin electrónico (Yin *et al.* 1996a, Yin *et al.* 1996b), que es una técnica más sensible a la utilizada en este trabajo y que fue de espectroscopia con luz UV para la detección de dienos conjugados (Recknagel and Glende 1984). Además, en esas membranas modelo se utilizaron concentraciones muy altas que van de 0.25 a 10 mM de FB<sub>1</sub>, mientras que nosotros usamos 10 y 20 µM de FB<sub>1</sub>. A estas diferencias también puede contribuir la

composición lipídica de los liposomas, que era de fosfatidilcolina (PC) y de tres diferentes sondas como n-SASL, CSL o T-SASL, y que carecían de proteínas que pudieran promover algún mecanismo de defensa ante la formación de radicales libres de oxígeno.

Otro objetivo de este trabajo fue medir el efecto de la FB<sub>1</sub> en la peroxidación de lípidos de membrana plasmática *in vivo*, en donde los embriones se embebieron en ausencia y presencia de FB<sub>1</sub> y de los cuales las fracciones subcelulares fueron aisladas. Primero se utilizaron las fracciones de homogenado y microsomal a diferentes concentraciones de proteína. Los resultados que se obtuvieron nos indicaron que la FB<sub>1</sub> produjo la formación de dienos conjugados en el homogenado a niveles muy cercanos al del control, pues no se observaron diferencias significativas. Esto pudiera deberse a que el homogenado contiene además de VMP, una gran cantidad de componentes celulares y cuerpos lipídicos que pudieran enmascarar el efecto de la fumonisina B<sub>1</sub> en alguna fracción membranal de manera particular. En microsomas las diferencias que se observaron fueron muy pequeñas y para verificar que esas pequeñas diferencias existían, se realizaron experimentos utilizando un control y dos diferentes concentraciones de FB<sub>1</sub> (10 y 20  $\mu$ M). Los resultados obtenidos en microsomas muestran que cuando se utilizó una concentración de 10  $\mu$ M de FB<sub>1</sub>, la formación de dienos conjugados se vio disminuida con respecto al control, mientras que cuando se utilizó la concentración de 20  $\mu$ M, la formación de dienos conjugados se vio incrementada con respecto al control. Por otra parte, cuando se midió la formación de dienos conjugados en VMP se vio que los niveles de dienos conjugados disminuyeron con respecto al control utilizando ambas concentraciones de FB<sub>1</sub>. Todo lo anterior pudiera deberse a que una concentración de 10  $\mu$ M de FB<sub>1</sub> sea suficiente para activar sistemas celulares de defensa antioxidantes que disminuyen la peroxidación de lípidos por debajo de los niveles basales, mientras que 20  $\mu$ M de FB<sub>1</sub> pudiera ser una concentración de toxina suficientemente alta que genere EROs en exceso, capaces de saturar a esos sistemas antioxidantes e impidiendo que lleven a cabo su función protectora. En otro experimento que se realizó midiendo la formación de dienos conjugados en VMP obtenidas de embriones que se habían embebido en presencia de luz, también se vio que los niveles de dienos conjugados disminuyeron con respecto al control utilizando concentraciones de 5 y 10  $\mu$ M FB<sub>1</sub>. Todos estos resultados en los que

no se observa un aumento de peroxidación lipídica por acción de la  $FB_1$  son interesantes, puesto que en ellos sucedió lo contrario a lo que se ha reportado en plántulas enteras de *Arabidopsis thaliana* (Stone *et al.* 2000. ) En este sistema se detectaron acumulaciones de especies reactivas de oxígeno, ésto se interpretó que se debía principalmente a que en plantas enteras se producen bajos niveles de EROs en condiciones normales por exposición a energía luminosa, durante el transporte de electrones o en procesos enzimáticos involucrados en sistemas redox (Rustérucci *et al.* 1996). Se ha reportado que la producción de EROs puede incrementarse considerablemente debido a una respuesta rápida al reconocimiento de un patógeno y principalmente a la presencia de fitotoxinas (Grant and Gary, 2000). Se conoce que durante los procesos metabólicos que suceden durante las fases iniciales de la imbibición, están incluidos procesos activos de generación y consumo de especies reactivas de oxígeno como el  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  (Puntarulo *et al.* 1991, Cakmak *et al.* 1993). Esto sugiere que la presencia de  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  pueden causar peroxidación de lípidos membranales que se pueden medir como un incremento en los niveles de dienos conjugados en algunas membranas (y que posiblemente sea lo que sucedió en los microsomas), o bien que estas especies reactivas de oxígeno pueden actuar como moléculas señal que activen múltiples respuestas de defensa que inhiban la peroxidación de lípidos membranales, y que posiblemente sea lo que sucedió en las vesículas de membrana plasmática (Wostaszek 1997, Breusegem *et al.* 2001). Es interesante que este efecto de la  $FB_1$  de disminuir los niveles de dienos conjugados se haya visto en fracciones microsomales y de membrana plasmática en condiciones en las que la  $FB_1$  fue añadida *in vitro* e *in vivo*, pero más marcadamente en estos últimos, sugiriendo que en la respuesta observada con la  $FB_1$  participan componentes celulares de localización tanto membranal como intracelular. Es posible que algunos de estos componentes sean las enzimas procesadoras de EROs como la catalasa, la superóxido dismutasa y la peroxidasa (Breusegem *et al.* 2001). Una manera de corroborar que la actividad de estas enzimas está siendo estimulada por la  $FB_1$  en nuestras condiciones experimentales sería medir estas actividades para determinar si hay un aumento que se correlacione con la menor producción de dienos conjugados por acción de concentraciones de 10 y 20  $\mu M$  de  $FB_1$  en la membrana plasmática.

Existen muchos reportes de toxinas fungales que inducen la formación de especies como oxígeno en singulete y superóxido en reacciones que son dependientes de

luz, como la cercosporina y las cebetinas que son producidas por hongos del género *Cercospora*, que son capaces de producir daño oxidativo en los lípidos membranales, y que pueden ser el origen de la pérdida de permeabilidad selectiva membranal que se observa en las células de plantas atacadas por estos hongos (Heiser *et al.* 1998). A diferencia de estas toxinas, nosotros no encontramos ningún efecto de la luz entre los niveles de dienos conjugados, lo cual sugiere que la FB<sub>1</sub> no actúa como inductor de lipoperoxidación a través de algún mecanismo como el de activación de la estructura para formar un oxígeno en singulete. Sin embargo, los experimentos con FB<sub>1</sub> en *Arabidopsis thaliana*, revelaron que la luz tenía un efecto de aumentar la formación de radicales libres. Ya que estos resultados fueron observados en la planta completa, es posible que los componentes celulares involucrados tengan una respuesta diferente a los que están presentes en nuestro sistema y que no podemos evaluar en nuestras fracciones de membrana plasmática.

Todos los resultados expuestos anteriormente de los experimentos *in vivo* donde se midió la formación de dienos conjugados por mg de proteína de membrana plasmática son muy interesantes, sin embargo, conformaron un patrón diferente a lo que se observó al estandarizar los niveles de dienos por mg de ácido graso solo en los experimentos *in vivo*, ya que en los experimentos *in vitro* utilizando concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$  de FB<sub>1</sub>, la cantidad de dienos conjugados no sufrió cambios con respecto al control cuando se expresó en términos de mg de proteína o por mg de ácido graso. En los experimentos del efecto de la FB<sub>1</sub> *in vivo*, cuando los resultados se expresan en términos de mg de ácido graso, con 10  $\mu\text{M}$  se obtuvo una disminución de los niveles de dienos conjugados, pero con 20  $\mu\text{M}$  un aumento. Estos resultados claramente indican que las mediciones dan valores diferentes según si se expresaron por mg de proteína o por mg de ácido graso, lo cual resulta lógico, ya que si bien los contenidos de proteína son similares en las muestras controles y las tratadas con FB<sub>1</sub>, los contenidos de ácido graso son diferentes como se pudo corroborar al medir los contenidos de ácidos grasos en ambas muestras. Los valores de ácidos grasos de la membrana plasmática obtenidos en este trabajo, son similares a los obtenidos en otras preparaciones (Gutiérrez-Nájera 2002) y en general se semejan a las obtenidas en membrana plasmáticas de raíces de plántulas de maíz (Bohn *et al.* 2001). Hay que hacer notar que en las membranas plasmáticas de los embriones de maíz expuestos a la FB<sub>1</sub> tienen un 29 % menos de

ácidos grasos insaturados (Gutiérrez-Nájera 2002), lo cual indica que la FB<sub>1</sub> de alguna manera reduce los sustratos potenciales de peroxidación. Sin embargo, es notable que a pesar de esta disminución, 20  $\mu$ M de FB<sub>1</sub> es capaz de aumentar 22 % los niveles de ácido graso *in vivo*.

Para poder determinar con una mayor precisión la formación de dienos conjugados, se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con luz UV a 234 nm para determinar ácidos grasos peroxidados, para esto se utilizó 1 mg de ácidos grasos de membrana plasmáticas obtenidas de embriones que se embebieron en ausencia y presencia de 20  $\mu$ M de FB<sub>1</sub>. Los resultados obtenidos indicaron que si hay congruencia entre los resultados obtenidos por HPLC y los que se obtuvieron midiendo dienos conjugados expresándose ambos por mg de ácido graso. Es decir los ácidos grasos totales de VMP expuestos con FB<sub>1</sub> sufrieron mayor peroxidación que los ácidos grasos del control. Desgraciadamente, la identidad de las especies peroxidadas no pudo establecerse debido a la carencia de estándares apropiados. Sin embargo, hay que hacer notar que los valores obtenidos para cada una de las especies de ácidos graso mostraron diferentes grados de peroxidación en las muestras control y en las provenientes de embriones tratados con FB<sub>1</sub>. Es decir, la toxina tuvo un efecto diferencial de peroxidación sobre ácidos grasos específicos.

Un factor cuya participación no puede ser descartada en los experimentos de la aplicación *in vivo* de la FB<sub>1</sub> es la acción de la FB<sub>1</sub> sobre la ceramida sintetasa, como ha sido reportado en especies de plantas como *Lemna paucicostata*, *Lycopersicon esculentum* y *Nicotiana tabacum* (Abbas *et al.* 1994). Al inhibir a esta enzima, la FB<sub>1</sub> produce una acumulación de los sustratos esfinganina y fitoesfinganina, mismos que han sido postulados como mensajeros celulares en vías de transducción de señales (Merrill *et al.* 2001). En el laboratorio, (Gutiérrez-Nájera 2002, Rivas San Vicente 2001) se ha medido la concentración de esfinganina y fitoesfinganina en homogenado y en la membrana plasmática en condiciones de adición *in vivo* de la FB<sub>1</sub> y se ha encontrado que 20  $\mu$ M de FB<sub>1</sub> aumenta la esfinganina de la membrana plasmática, mientras que la fitoesfinganina no cambia con respecto al control. Sería muy relevante que estas bases esfingoideas estuvieran involucradas en la activación de mecanismos de apagamiento de radicales libres como una estrategia de defensa ante un producto secretado por un patógeno, como es el caso de la FB<sub>1</sub>.

## CONCLUSIONES

### Conclusiones particulares

- a) El método de detección de productos de peroxidación de lípidos por formación de los aductos respectivos con el TBA no constituyó una técnica que nos permitiera medir adecuadamente diferencias de peroxidación de lípidos de membrana en nuestro sistema biológico.
- b) Las técnicas de detección espectrofotométrica de dienos conjugados y de detección por HPLC de fosfolípidos hidroperoxidados produjeron resultados reproducibles, confiables y consistentes entre sí, de los niveles de peroxidación que sufren los lípidos de membranas plasmática por efecto de la FB<sub>1</sub>.

### Conclusión general

- a) Los lípidos de membrana plasmática de embriones de maíz sufren peroxidación en condiciones normales fisiológicas.
- b) *In vitro*, la FB<sub>1</sub> no aumenta el efecto de peroxidación de lípidos de membrana plasmática, si se estima la peroxidación en términos del contenido de ácidos grasos e *in vivo*, la FB<sub>1</sub> aumenta el efecto de peroxidación de lípidos de membrana plasmática, cuando se estima la peroxidación en términos del contenido de ácidos grasos. Sin embargo, si los valores de peroxidación son expresados en términos de mg de proteína, se obtiene una disminución de los niveles de dienos conjugados *in vivo*. Esto revela que la relación proteína lípido en la membrana está alejada de 1 en presencia de FB<sub>1</sub> y que por tanto el efecto de la FB<sub>1</sub> debe tomar en cuenta esta relación para ser correctamente interpretado y comparado con los datos en la literatura.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, Sessions AE, Wang E, Merrill AH Jr, y Riley RT. Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiology* (1994) **106**: 1085-1093.
2. Abbas HK y Vesonder RF. Isolation and purification of AAL-toxin from *Alternaria alternata* grow on rice. *Toxicon* (1993) **31**: 355-358.
3. Abado-Becognee K, Amondo T, Ennamany R, Fleurat-Lessard F, Shier T, Badria F, Ekué E. Cytotoxicity of fumonisin B1: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA synthesis. *Archives in Toxicology* (1998) **72**: 233-236.
4. Batoko H, d'Exaerde AK, Kinet JM, Bouharmont J, Gage RA, Maraitte H, Boutry M. Modulation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phytotoxic lipodepsipeptides produced by the plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae*. *Biochimica et Biophysica Acta* (1998) **1372**: 216-226.
5. Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G and Vleggaar R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal Chemical Society. Chemical Communications* (1988) **11**: 743-745.
6. Blaney BJ. *Fusarium* and *Alternaria* Toxins. En: *Fungi and mycotoxins in stored products* (Champ BR, Highley E, Hocking AD and Pitt JI Eds.) *Proceeding of an international conference held at Bangkok, Thailand. Aciar Proceedings* (1999) No. **36**: 86-96.
7. Blein JP, Bourdil I, Rossignol M, and Scalla R. *Cercospora beticola* toxin inhibits vanadate-sensitive H<sup>+</sup> transport in corn root membrane vesicles. *Plant Physiology* (1988) **88**: 429-434.

8. Blumwald E, Aharon GS, Lam B C-H. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* (1998) 3: 342-346.
9. Bohinski RC. *Bioquímica 5a Edición*. Addison-Wesley Iberoamericana. Argentina, México (1991) pp. 419-440.
10. Bohn M, Heinz E, and Luthje S. Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2001) 387: 35-40.
11. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. Segunda reimpresión. Méndez Editores, México D.F. (1994), pp 397-402.
12. Breusegem FV, Vranová E, Dat JF, Inzé D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* (2001) 161: 405-414.
13. Cakmak I, Strbac D, y Marschner H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany* (1993) 44: 127-132.
14. Chelkowski J. Cereal grain mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. *Developments in Food Science* 26. Elsevier, Amsterdam (1991) pp. 1-3, 10-18, 54-62.
15. Clarkson JM. Fungi. En: *Molecular Plant Pathology: A practical approach*. (1992) Vol.1. (Gurr SJ, McPherson and Bowles DJ Eds.) Oxford University Press. Oxford. pp. 67-68.
16. Dawson RJ. A Global View of the Micotoxin Problem. En: *Fungi and Micotoxins in Stored Products* (Champ BR, Highley E, Hocking AD and Pitt JI Eds.) *Proceeding of an international conference held at Bangkok, Thailand*. *Aciair Proceedings* (1999) No.36: 22-27.
17. Delfin-Aguilar I, López-Barrera F, and Hernández-Muñoz R. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental

- models of liver regeneration: Partial hepatectomy and acute CCL<sub>4</sub> administration. *Hepatology* (1996) **24**: 657-662.
18. Dupuy J, Bars P y Boudra H. Thermostability of Fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. *Applied and Environmental Microbiology* (1993) **59**: 2864-2867.
19. Foyer C, Descourvieres P, Kunert K. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* (1994) **17**: 507-523.
20. Fukuda H, Shima H, Vesonder RF, Tokuda H, Nishino H, Katoh S, Tamura S, Sugimura T y Nagao M. Inhibition of protein serine/threonine phosphatases by fumonisin B<sub>1</sub> a mycotoxin. *Biochemical Biophysical Research Communications* (1996) **220**: 160-165.
21. Garibay FJ. Efecto de la fitotoxina B<sub>1</sub> en la actividad de la 1,3-B-D glucan sintetasa de embriones de maiz. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2000 pp. 49-50.
22. Gelderblom W, Jaskiewicz K, Marasas W, Thiel PG, Horak RM, Vlegaar R, and Kriek N. Fumonisinis-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* (1988) **54**: 1806-1811.
23. Goodwin TW and Mercer EI. *Introduction to Plant Biochemistry*. Second edition. Pergamon Press, Oxford (1983) pp. 21-46, 273-285.
24. Goudet C, Véry AA, Milat ML, Ildefonse M, Thibaud JP, Sentenac H, and Blein JP. Magnesium ions promote assembly of channel-like structures from *Cercospora beticola*. *The Plant Journal*. (1998) **14**: 359-364.
25. Grant JJ and Gary JL. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* (2000) **124**:21-29.

26. Gutiérrez-Nájera NA. Efecto de la  $FB_1$  sobre la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática de embriones de maíz. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. (1999) pp. 6-12, 55.
27. Gutiérrez-Nájera NA. Interacción de la fumonisina  $B_1$  con la membrana plasmática: efectos en la bicapa lipídica y en la actividad enzimática. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM. 2002.
28. Gutteridge JMC and Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. (1990) **15**: 129-135.
29. Hammond-Kosack K and Jones DGJ. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* (1996) **8**: 1773-1791.
30. Heiser I, Obwald W, Elstner EF. The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins. *Plant Physiology and Biochemistry* (1998) **36**: 703-713.
31. Horton HR, Moran AL, Ochs SR, Rawn JD, Scrimgeour KG. *Bioquímica*. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. México (1995) pp. 9.1-9.37.
32. Huang AHC. Oleosins and oil bodies in seed and other organs. *Plant Physiology* (1996) **110**: 1055-1061.
33. Huang C, Dickman M, Henderson G y Jones C. Repression of protein kinase C and stimulation of cyclic AMP response elements by fumonisina, a fungal encoded toxin which is a carcinogen. *Cancer Research* (1995) **55**: 1655-1659.
34. Isaac S. *Fungal-Plant Interactions*. Chapman Hall, 1<sup>a</sup> edición, UK, (1991) pp. 106-115, 147-157, 252-253.
35. Knogge W. Fungal infection of plants. *The Plant Cell* (1996) **8**: 1711-1722.
36. Lamprecht SC, Marasas WFO, Alberts JFME, Gelderblom WCA, Sheparol GS, Thiel PG y Calitz FJ. Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. *Phytopathology* (1994) **84**: 383-391.

37. Larsson C, Moller IM y Widell S. Introduction to the Plant Plasma Membrane - Its Molecular Composition and Organization. En: *The Plant Plasma Membrane* (Larsson CY Moller IM. eds.). Springer-Verlag. Berlin. (1990) pp. 1-15.
38. Larsson C, Sommarin M, y Widell S. Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Methods in Enzymology* (1994) **228**: 451-469.
39. Lehninger AL. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. (1995) pp. 285-309.
40. Lynch DV. Enzymes of sphingolipid metabolism in plants. *Methods in Enzymology*. (2000) **311**: 130-149.
41. Marasas WFO. *Fusarium moniliforme*: A micotoxicological miasma. En: *Developments in Food Science*. Vol. 7 (Kurata H y Veno y eds) Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. (1985) pp. 19-28.
42. Marasas WFO, Nelson PE. *Micotoxicology: Introduction to the mycology. Plant pathology, chemistry, toxicology and pathology of naturally occurring mycotoxicoses in animals and man*. University Park: The Pennsylvania State University Press (1987) pp. 102.
43. Mawatari S and Murakami K. Analysis of membrane phospholipid peroxidation by isocratic High-Performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Analytical Biochemistry* (1998) **264**: 118-123.
44. Merrill AH, Echten GV, Wang E y Sandhoff K. Fumonisin B<sub>1</sub> inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and the *novo* sphingolipid biosynthesis in culture neurons *in situ*. *The Journal of Biological Chemistry* (1993) **268**: 27299-27306.
45. Merrill AH, Sullards MC, Wang E, Voss KA, and Riley RT. Sphingolipid metabolism: Roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environmental Health Perspectives* (2001) **109**: 283-289.

46. Momamy FA, Dombrink-Kurtzman MA. Molecular dynamics simulation on de mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub>. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (2001) **49**: 1056-1061.
47. Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. *Bioquímica de Harper*. 13ª Edición. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. (1994) pp. 135-142.
48. Müller G. *Microbiología de los alimentos vegetales*. Editorial Acribia, Zaragoza, (1981) pp. 122-123.
49. Nair MG. Fumonisin and human health. *Annals of Tropical Paediatrics*. (1998) **18**: S47-S52.
50. Nelson PE. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology*. (1993) **31**:233-252.
51. Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania. The Pennsylvania State University Press. (1983) pp. 128-131.
52. Ottolenghi A. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (1959) **79**: 355-363.
53. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*. (1977) **83**: 346-356.
54. Pitt JI and Hocking AD. Significance of Fungi in Stored Products. En: *Fungi and Micotoxins in Stored Products* (Champ BR, Highley E, Hocking AD and Pitt JI eds.) *Proceeding of an international conference held at Bangkok, Thailand Aciar Proceedings No.36*. (1999) pp. 16-21.
55. Puntarulo S, Galleano M, Sánchez RA y Boveris A. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochemica et Biophysica. Acta* (1991) **1074**: 227-283.

56. Recknagel RO and Glende EA. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods in Enzymology*. (1984) **105**: 331-337.
57. Rivas San Vicente LM. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de los niveles de bases esfingoideas en ejes embrionarios de maíz expuestos a la fumonisina B<sub>1</sub>. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2001.
58. Roberts MR, and Bowles DJ. Fusaricocin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiology*. (1999) **119**: 1243-1250
59. Rochester CP, Kjellbom P. y Larsson C. Lipid composition of plasma membrane from barley leaves and roots, spinach leaves and cauliflower inflorescences. *Physiologia Plantarum*. (1987) **71**: 257-263.
60. Rustérucci C, Stallaert V, Milat ML, Pugin A, Ricci P, and Blein JP. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiology*. (1996) **111**: 885-891.
61. Sánchez-Nieto S, García Rubio O, Pacheco-Moisés F, Carballo A, Rodríguez-Sotres R, Gavilanes Ruiz M. Purification of plasma membranes from dry maize embryos. *Physiologia Plantarum* (1997) **101**: 157-164.
62. Scheel D. Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* (1998) **1**: 305-310.
63. Scott PM. Fumonisin. *Journal of Food Microbiology* (1993) **18**: 257-270.
64. Simon-Plas F, Gomès E, Milat ML, Pugin Alain, and Blein JP. *Cercospora beticola* Toxins. *Plant Physiology* (1996) **111**: 773-779.
65. Stone MJ, Heard EJ, Asai T, and Ausubel MF. Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B<sub>1</sub> and selection of fumonisin B<sub>1</sub>-resistant (fbr) *Arabidopsis mutants*. *The Plant Cell*. (2000) **12**: 1811-1822.
66. Stryer L. *Bioquímica*. 3ª. Ed. Editorial Reverté S. A. Madrid, España. (1990) pp. 289-290.

67. Suzuki YS, Wang Y, and Takemoto JY. Syringomycin-stimulated phosphorylation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from red beet storage tissue. *Plant Physiology* (1992) **99**: 1314-1320.
68. Thuleau P, Graziana A, Rossignol M, Kauss H, Auriol P, and Ranjeva R. Binding of the phytotoxin zinniol stimulates the entry of calcium into plant protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (1988) **85**: 5932-5935.
69. Trenholm HL, Charmley LL, Prelusky DB, and Bryden WL. Safety of Mycotoxins in Animal Feeds and Approaches to Detoxification. En: *Fungi and Micotoxins in Stored Products* (Champ BR, Highley E, Hocking AD and Pitt JI eds.) Proceeding of an international conference held at Bangkok, Thailand. *Aciair Proceedings No.36*. (1999) pp. 136-141.
70. Van Asch MAJ, Rijkenberg FHJ y Coutinho TA. Phytotoxicity fumonisin B<sub>1</sub>, moniliformin and the toxin T2 to com callus cultures. *Plant Physiology* (1992) **106**: 1085-1093.
71. Wojtaszek P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* (1997) **322**: 681-692.
72. Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Troy AL, Page SW, and Sphon JA. Effects of fumonisin B<sub>1</sub> and (hydrolyzed) fumonisin backbone AP<sub>1</sub> on membranes: A spin-label study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (1996a) **135**: 13-22
73. Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Page SW, and Sphon JA. Effects of fumonisin B<sub>1</sub> on lipid peroxidation in membranes. *Biochimica et Biophysica. Acta* (1998) **1371**: 134-142.
74. Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Troy AL, Page SW, and Sphon JA. Effects of fumonisin B<sub>1</sub> on oxigen transport in membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (1996b) **225**: 250-255.