

00524  
22



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IDENTIFICACION DE POLIPEPTIDOS  
FOSFORILADOS DIFERENCIALMENTE  
EN EMBRIONES DE MAIZ EXPUESTOS A  
LA FUMONISINA B<sub>1</sub>.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA**  
P R E S E N T A :  
**CARMONA SALAZAR LAURA**



MÉXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**

2003



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**

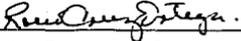
Presidente: M. en C. Ma. Del Carmen Parra González  
Vocal: Dra. Marina Gavilanes Ruiz  
Secretario: Dr. Jesus Fernando Montiel Aguirre  
1er. Suplente: Dr. Felipe Cruz García  
2do. Suplente: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

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

Asesor del Tema:

  
Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Supervisor Técnico:

  
Dra. Rocío Cruz Ortega

Sustentante:

  
Laura Carmona Salazar

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de tesis fue llevado a cabo bajo la dirección de la Dra. Marina Gavilanes Ruíz y la supervisión técnica de la Dra. Rocío Cruz Ortega en el Laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

Agradecemos la ayuda técnica de la Q. F. B. Consuelo Enriquez Arredondo, de la Q. Laurel Fabila Ibarra y del M. en C. Raúl Aguilar Caballero.

Se agradece a la Dra. Estela Sánchez de Jiménez por habernos permitido el uso del PROTEAN IEFcell en el Laboratorio 103 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

Agradecemos al Dr. Guillermo Mendoza Hernández el procedimiento de secuenciación de proteína realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

Agradezco a la Dra. Ana Luisa Anaya Lang por su hospitalidad al habernos permitido realizar parte de los experimentos de esta tesis en su Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular.

Agradezco al jurado asignado por la revisión y las correcciones realizadas para el presente trabajo.

Laura Carmona Salazar, recibió una beca de tesis del proyecto DGAPA No. IN208300 y del Subprograma 127 Formación Básica en Investigación (Coordinación de Superación Académica) de la Facultad de Química.

El trabajo de tesis fue financiado por el proyecto DGAPA IN208300 de la UNAM.

## **DEDICATORIAS**

A mis queridos padres gracias por todo el amor y apoyo que me han brindado, por darme esta oportunidad, la cual constituye la herencia más valiosa que pudieron otorgarme.

A mi amado hijo gracias por haber llegado en el momento preciso y por darme esta dicha tan maravillosa de tenerte a mi lado.

A mi hermano gracias por todo el cariño y paciencia que me has tenido todo este tiempo.

A todos mis familiares y amigos gracias por el apoyo incondicional que me han brindado.

7

A la Doctora Marina Gavilanes Ruíz gracias por todo el apoyo y consejos que me brindó todo este tiempo que fue muy difícil para mí, pero sobre todo gracias por ser mi amiga.

Al Doctor Javier Plasencia de la Parra gracias por el apoyo y dedicación que me otorgó todo este tiempo.

A todos mis amigos del Laboratorio 101 gracias por toda la ayuda que me otorgaron, pero sobre todo por la amistad tan sincera que me brindaron.

A la Doctora Rocío Cruz Ortega gracias por la supervisión técnica y por todas las atenciones que tuvo conmigo.

A mi querida Universidad gracias por darme la oportunidad de formar parte de ti.

A mi querida Facultad de Química gracias por la formación que me has brindado y por todas las experiencias tan inolvidables que pasé en tus aulas y pasillos.

**INDICE**

**RESUMEN**.....1-1

**INTRODUCCION**.....2-40

**A) Infección de plantas por patógenos**.....2-6

- **Inoculación**.....2-2
- **Penetración**.....2-4
  - **Penetración directa**.....3-4
  - **Penetración a través de heridas**.....4-4
  - **Penetración a través de aperturas naturales**.....4-4
- **Infección**.....4-5
- **Colonización**.....5-6

**B) Productos secundarios del patógeno**.....7-7

**C) Toxinas**.....8-12

- **Toxinas bacterianas**.....8-10
- **Micotoxinas**.....10-12

**D) Fumonisina B<sub>1</sub>**.....12-16

**E) Mecanismos de defensa de la célula de la planta ante el ataque del patógeno**.....16-23

- **Respuesta hipersensible**.....18-18
- **Especies reactiva de oxígeno**.....19-20
- **Fortificación de la pared celular**.....20-21
- **Acido benzóico y ácido salicílico**.....21-21
- **Proteínas relacionadas con la defensa**.....22-22
- **Lipoxigenasas**.....22-22
- **Fitoalexinas**.....23-23

**F) Sistemas de transducción de señales**.....23-36

- **Receptores**.....24-25
- **Cinasas**.....25-27

• Cinasas de la membrana plasmática.....	27-30
• Segundos mensajeros.....	30-36
a) AMPc.....	30-31
b) Ca <sup>2+</sup> .....	31-31
c) Lípidos.....	31-36
▪ Ceramida sintetasa.....	33-34
▪ Cinasas de ceramida.....	34-34
▪ Cinasas de esfingosina.....	34-36
G) Sistemas de transducción involucrados en la respuesta de defensa.....	36-40
• Proteínas G.....	37-37
• Homeostasis del calcio.....	37-38
• NADPH oxidasa.....	38-39
• H <sup>+</sup> -ATPasa de la membrana plasmática.....	40-40
HIPÓTESIS.....	41-41
OBJETIVO GENERAL.....	42-42
OBJETIVOS PARTICULARES.....	42-42
MATERIALES Y METODOS.....	43-62
I. Material biológico.....	43-43
II. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática.....	43-46
III. Determinación de proteína.....	46-46
IV. Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas en vesículas de la membrana plasmática.....	47-49
V. Separación de proteínas por enfoque isoeléctrico (EIE) (Primera dimensión).....	49-54
VI. Separación de proteínas por peso molecular (Segunda dimensión).....	54-57
VII. Tinción de geles.....	57-59
VIII. Secado de geles.....	59-59
IX. Exposición de los geles bidimensionales a placas de autorradiografía.....	59-60

<b>X.</b>	<b>Análisis de datos por densitometría.....</b>	<b>60-61</b>
<b>XI.</b>	<b>Electrotransferencia de geles bidimensionales a membranas de PVDF.....</b>	<b>61-62</b>
<b>XII.</b>	<b>Procedimiento de secuenciación de aminoácidos del extremo amino terminal.....</b>	<b>62-62</b>
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>63-90</b>
<b>1.</b>	<b>Determinación de las condiciones óptimas para la separación de proteínas de la membrana plasmática por peso molecular.....</b>	<b>63-63</b>
<b>2.</b>	<b>Ensayo de solubilidad de las vesículas de membrana plasmática.....</b>	<b>64-64</b>
<b>3.</b>	<b>Optimización de las condiciones para la separación de proteínas membranales por enfoque isoeléctrico (EIE).....</b>	<b>65-66</b>
<b>4.</b>	<b>Ensayos de fosforilación.....</b>	<b>67-85</b>
<b>I.</b>	<b>Efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz.....</b>	<b>67-74</b>
<b>a)</b>	<b>Análisis de la separación de proteínas por EIE en un intervalo de pH de 3-10.....</b>	<b>67-70</b>
<b>b)</b>	<b>Análisis de la separación de proteínas en un intervalo de pH de 4-7.....</b>	<b>70-74</b>
<b>II.</b>	<b>Efecto de la esfinganina en la fosforilación de polipéptidos membranales de embriones de maíz.....</b>	<b>75-85</b>
<b>a)</b>	<b>Determinación de la elección de la base esfingóidea a evaluar en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática.....</b>	<b>75-77</b>
<b>b)</b>	<b>Efecto de 1 nM de esfinganina en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática separadas en un intervalo de pH de 3 a 10.....</b>	<b>78-80</b>
<b>c)</b>	<b>Efecto de 1 nM de esfinganina en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática separadas en un intervalo de pH de 4 a 7.....</b>	<b>80-85</b>

---

<b>5. Determinación de la secuencia del extremo amino terminal de polipéptidos seleccionados de acuerdo a su fosforilación diferencial por efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub> y Esfinganina.....</b>	<b>86-90</b>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>91-100</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>101-101</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>102-102</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>103-107</b>

**INDICE DE TABLAS**

- I. Efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub> en plantas
- II. Secuencias consenso para cinasas de proteína
- III. Algunas señales que utilizan el AMP<sub>c</sub> como segundo mensajero
- IV. Composición de medios utilizados en varios pasos de la obtención de fracciones subcelulares de los embriones embebidos incluyendo la de vesículas de membrana plasmática
- V. Composición y soluciones empleadas para preparar la mezcla de fases
- VI. Mezcla general para el ensayo de fosforilación
- VII. Mezcla de reacción
- VIII. Composición y preparación del amortiguador de solubilización para enfoque isoeléctrico (pH 3/10)
- IX. Composición del gel para EIE
- X. Composición de los geles de poliacrilamida-SDS
- XI. Rendimientos obtenidos en el ensayo de solubilidad
- XII. Marcaje diferencial de proteínas de la membrana plasmática con AT<sup>32</sup>P en ausencia y presencia de Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>)
- XIII. Análisis del marcaje diferencial de proteínas de la membrana plasmática con AT<sup>32</sup>P en ausencia y presencia de esfinganina (SN)
- XIV. Identificación de las proteínas fosforiladas diferencialmente por adición de la Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) y la Esfinganina (SN)

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Morfología y multiplicación de algunos grupos de patógenos en las plantas
- Figura 2. Fórmula estructural de la Fumonisina B<sub>1</sub>, Toxinas AAL y Esfinganina
- Figura 3. Diagrama del ensayo de imbibición
- Figura 4. Diagrama para la obtención de la fracción microsomal
- Figura 5. Diagrama para el enriquecimiento de las VMP
- Figura 6. Calibración para el gel de separación 10% T, 3% C
- Figura 7. Optimización de las condiciones de separación en primera y segunda dimensión en proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz
- Figura 8. Patrón electroforético de proteínas estándar separadas por punto isoeléctrico y peso molecular.
- Figura 9. Ensayo de fosforilación de proteínas de membrana plasmática en ausencia y presencia de 10  $\mu$ M de Fumonisina B<sub>1</sub>
- Figura 10. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz para el intervalo de pH de 3 a 10.
- Figura 11. Efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática separadas en un intervalo de pH de 3 a 10
- Figura 12. Verificación de la cantidad de proteína de la membrana plasmática de embriones de maíz para el ensayo del intervalo de pH 4 a 7
- Figura 13. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz para el intervalo de pH de 4 a 7.
- Figura 14. Efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática separadas en un intervalo de pH de 4 a 7
- Figura 15. Efecto de distintas bases esfingoideas y ceramida sobre la fosforilación de proteínas de membrana plasmática
- Figura 16. Efecto de la concentración de la Fumonisina B<sub>1</sub> y de la esfinganina en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática

- . Figura 17. Ensayo de fosforilación en ausencia y presencia de la esfinganina (SN)
- . Figura 18. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz expuestas a esfinganina separadas en un intervalo de pH de 3 a 10
- . Figura 19. Efecto de la Esfinganina en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática separadas en un intervalo de pH de 3 a 10
- . Figura 20. Verificación de la cantidad de proteína de la membrana plasmática de embriones de maíz para el ensayo del intervalo de pH de 4 a 7
- . Figura 21. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz expuestas a esfinganina separadas en un intervalo de pH de 4 a 7
- . Figura 22. Efecto de la Esfinganina en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática separadas en un intervalo de pH de 4 a 7
- . Figura 23. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz del experimento control
- . Figura 24. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz obtenidos a partir de tiras para EIE
- . Figura 25. Efecto de la Esfinganina en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática obtenidos a partir de tiras para EIE
- . Figura 26. Verificación de la cantidad de proteína de la membrana plasmática de embriones de maíz
- . Figura 27. Membrana de PVDF teñida con azul de Coomassie

ABREVIATURAS

- . **AAL.**- Término referido a las toxinas producidas por *Alternaria alternata*.
- . **ABA.**- Ácido abscísico
- . **AMP<sub>e</sub>.**- Adenosin monofosfato cíclico
- . **ATP.**- Adenosin trifosfato
- . **BA.**- Ácido benzoico
- . **CHAPS.**- 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
- . **DEX.**- Dextrán
- . **DTT/DTE.**- DL-ditiotreitol
- . **EDTA.**- Ácido etilendiaminotetracético
- . **EGTA.**- Etilen glicol-bis (β-aminoetil éter) N,N. N'. N'-Ácido tetracético
- . **EIE.**- Enfoque isoelectrico
- . **FB<sub>1</sub>.**- Fumonisina B<sub>1</sub>
- . **HEDTA.**- Ácido N. Hidroxietilendiamina tetracético
- . **HEPES.**- N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-(2-Ácido etanosulfónico)
- . **HPLC.**- Cromatografía de líquidos de alta resolución
- . **HR.**- Respuesta de hipersensibilidad
- . **LOX.**- Lipoxigenasa
- . **MAPK.**- Cinasas de proteína activadas por mitógeno
- . **MF.**- Mezcla de fases
- . **PEG.**- Polietilenglicol
- . **pHi.**- pH isoelectrico

- . **PR.-** Proteínas relacionadas con la defensa
- . **PVDF.-** Polivinildifluoruro
- . **ROS.-** Especies reactivas de oxígeno
- . **SA.-** Ácido salicílico
- . **SDKs.-** Cinasas de proteína dependientes de esfingosina
- . **SDS.-** Dodecil sulfato de sodio
- . **Ser.-** Serina
- . **SF.-** Sistema de fases
- . **SFS.-** Fitoesfingosina
- .  **$\sigma$ .-** Desviación estándar
- . **SN.-** Esfinganina
- . **SOD.-** Superóxido dismutasa
- . **SIP.-** Esfingosina-1-fosfato
- . **TEMED.-** N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina
- . **Thr.-** Treonina
- . **TNF $\alpha$ .-** Factor de necrosis tumoral alfa
- . **TRIS (Trizma base).-** Tris (hidroximetil) amino metano
- . **Tyr.-** Tirosina
- . **VMP.-** Vesículas de membrana plasmática
- . **x.-** Promedio

## RESUMEN

*Fusarium moniliforme* es uno de los hongos más asociados a la contaminación de alimentos de la dieta básica humana y animal. Las toxinas producidas por este hongo son ácido fusárico, moniliforminas y fumonisinas (Nelson 1992). De las fumonisinas, la B<sub>1</sub> es la más abundante y tóxica, de ahí que se hayan realizado muchos estudios referentes a su detección y estabilidad en granos contaminados y en sus productos derivados, así como a aspectos toxicológicos y patológicos en especies animales y en humanos. La fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) también tiene efectos tóxicos en plantas de diferentes especies, afectando su crecimiento y llegando a producir putrefacción de hojas, frutos y plantas enteras (Abbas *et al.*, 1992, Doehliert *et al.*, 1994, Nelson 1992).

En células vegetales, como en células animales, la FB<sub>1</sub> inhibe a la ceramida sintetasa, enzima clave en la síntesis de esfingolípidos. Como resultado de esta inhibición, la célula acumula bases esfingoideas como fitoesfingosina y esfinganina. Estas bases han sido señaladas como moléculas que participan como segundos mensajeros en sistemas de transducción de señales externas contra las que la célula tiene que reaccionar (Huviler *et al.*, 2000, Ng *et al.*, 2001). Los elementos iniciales de las vías de transducción de señales se localizan generalmente en la membrana plasmática. Entre estos elementos se encuentran las cinasas, enzimas que transfieren un grupo fosfato a sus sustratos (proteínas).

La estructura anfipática de la fumonisina sugiere que se puede intercalar en la membrana plasmática (Riley *et al.*, 1994, Abbas *et al.*, 1994), y se ha encontrado que la FB<sub>1</sub> estimula la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz por cinasas de calcio (Zomosa, 2000).

En el presente trabajo, se utiliza un sistema modelo basado en la interacción FB<sub>1</sub> – membrana plasmática de células embrionarias de maíz para entender el efecto que la FB<sub>1</sub> y las bases esfingoideas pueden tener en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática. Se encontró que tanto la FB<sub>1</sub> como la esfinganina estimulan la fosforilación de 6 y 11 proteínas membranales respectivamente. La identificación de estos polipéptidos puede ayudar a conocer el modo molecular de acción de la toxina producida por su patógeno y las reacciones de defensa producidas por la célula vegetal huésped y en las que están involucradas las bases esfingoideas.

## **INTRODUCCIÓN**

### **A) INFECCIÓN DE PLANTAS POR PATÓGENOS.**

Las plantas constituyen uno de los grupos taxonómicos más importantes por su abundancia en el planeta, directa o indirectamente son fuente alimenticia de humanos y animales, siendo ésta la principal razón del estudio de sus enfermedades, ya que tienen gran impacto en la economía y salud mundiales.

De todos los seres vivos existentes en la Tierra, sólo una minoría tiene la capacidad de parasitar a las plantas. Estos patógenos pertenecen a grupos taxonómicos diferentes, entre los que podemos citar: virus, bacterias, protozoarios, hongos, nemátodos y plantas superiores parasitarias.

Cuando un patógeno ataca a la planta, la manifestación de la enfermedad va a depender de diversos factores ambientales, físicos y bioquímicos.

El desarrollo de la enfermedad involucra muchos cambios, tanto en la planta como en el patógeno, existiendo una serie de eventos que constituyen el ciclo de la enfermedad que son: inoculación, penetración, establecimiento de la infección, colonización (invasión) que abarca el crecimiento y reproducción del patógeno, así como su diseminación.

#### **Inoculación**

Está referida al momento en que el patógeno entra en contacto con la planta, y que puede llegar a resultar en su enfermedad, pero esto depende de varios factores como serían la concentración mínima crítica del patógeno inoculado, las condiciones ambientales, la susceptibilidad de la planta y los mecanismos rápidos de defensa de la misma, entre otros.

#### **Penetración**

Todos los patógenos en su estado vegetativo son capaces de iniciar inmediatamente una infección. Sin embargo, las esporas micóticas y las semillas de plantas superiores parasitarias requieren germinar primeramente, para lo que requieren de ciertas condiciones ambientales específicas, como son temperatura, luz, humedad, etc.

Los factores que determinan el reconocimiento entre el hospedero y el patógeno, todavía no son muy claros. Se asume que cuando el patógeno entra en contacto con el

hospedero, surge una serie de eventos que disparan una respuesta pronta en el organismo involucrado, que pueden resultar en el desarrollo del patógeno y tal vez de la enfermedad o bien en un proceso de resistencia. Se desconocen todos los eventos, pero se cree que están involucradas varias vías, estructuras y sustancias bioquímicas. Estas pueden incluir estructuras o componentes señales específicas del hospedero, o moléculas evocadoras específicas del patógeno, y cualquiera de ellos puede inducir acciones específicas o la formación de productos específicos en el otro organismo.

Los patógenos contactan la superficie de las plantas por penetración directa, a través de aperturas naturales o a través de heridas. La penetración no siempre conduce a la infección. Algunos organismos que penetran células de la planta que no son susceptibles a éstos, no desarrollan la enfermedad y al no poder proceder más allá de la etapa de penetración mueren sin producir la enfermedad.

#### Penetración directa.

Es probablemente el tipo más común de penetración de hongos y nemátodos y el único para plantas superiores parasitarias, las bacterias nunca utilizan esta vía de penetración (Agrios, 1997). Los hongos constituyen un grupo altamente versátil, son organismos eucarióticos carbono – heterotrófos y han ocupado con éxito la mayor parte de los hábitats naturales. La gran mayoría de los hongos son saprófitos estrictos, menos del 10% de las 100 000 especies hasta ahora descritas son capaces de colonizar plantas, y solo una fracción pequeña es capaz de ocasionarles enfermedad (Knogge, 1996). La penetración directa de muchos de los patógenos micóticos requiere de una perforación activa a través de las barreras externas de la planta, a menudo asociada con la formación del apresorio (Knogge, 1998). El apresorio es un tipo de órgano de penetración altamente especializado, al igual que la hifa fina, éstos son formados cuando el micelio o tubo germinal son el punto de contacto con la superficie de la planta. La hifa fina crece hacia la superficie de la planta y perfora la cutícula y pared celular a través de fuerzas mecánicas y enzimáticas, por otro lado el apresorio se forma al final del tubo germinal, el cual suele ser de forma bulbar o cilíndrica con la parte superficial plana (Agrios, 1997). Se han discutido algunos factores de la planta que pueden estar involucrados en la inducción del apresorio, como algunos monómeros de cutina y otras moléculas de la superficie de la planta que son de particular interés. Además de los

factores de la planta. hay moléculas de la superficie del hongo que parecen estar relacionadas en la inducción del apresorio (Knogge, 1998).

#### Penetración a través de heridas.

Todas las bacterias, la mayoría de los hongos, algunos virus y todos los viroides entran a la planta a través de heridas. En el caso de virus, micoplasmas y algunas bacterias exigentes lo hacen por medio de vectores que son organismos específicos, en general insectos.

Las heridas pueden ser viejas o recientes y pueden consistir en tejidos lacerados o muertos; estas lesiones pueden ser resultado de factores ambientales, como aquellas causadas por el viento, ráfagas granizadas, heladas, calor abrasador o fuego; sitios de alimentación de animales por ejemplo, insectos, nemátodos, gusanos y animales superiores; por prácticas culturales como son el cultivo, la cosecha, la poda, injertos, trasplantes, riego; lesiones causadas por sí mismas como son cicatrices en las hojas, grietas en la raíz y finalmente heridas o lesiones causadas por otros patógenos (Agrios, 1997).

#### Penetración a través de aperturas naturales.

Algunos hongos y bacterias entran a la planta a través de los estomas, algunos hongos llegan a desarrollar un mecanismo que utiliza características topográficas de la superficie del hospedero (Knogge, 1998), el mecanismo bioquímico no ha sido aún entendido, pero se cree que están involucradas moléculas del citoesqueleto (Knogge, 1996 y 1998). Otras aperturas utilizadas son los hidátodos y nectarios, los cuales son poros abiertos permanentes en las hojas, y lenticelas, que son aperturas que permiten el paso de aire (Agrios, 1997).

En el caso de la penetración de hongos y bacterias, éstos generalmente secretan una mezcla de enzimas hidrolíticas incluyendo cutinasas, celulasas, pectinasas y proteasas (Knogge, 1998).

#### **Infección**

Es el proceso mediante el cual el patógeno establece contacto con células o tejidos susceptibles del hospedero y obtiene sus nutrientes a partir de éste. Gracias a este proceso el patógeno crece o se multiplica o ambos y puede llegar a invadir y colonizar grandes o pequeñas extensiones en la planta (Agrios, 1997).

Entre los requerimientos para una infección exitosa por los patógenos están: la unión con la superficie del hospedero, así como la degradación de sus barreras físicas y químicas, la producción de toxinas y la inactivación de los mecanismos de defensa de la planta.

La regulación de los genes de patogenicidad es un fenómeno importante que se produce en el patógeno, y que implica una compleja interacción de señales entre el patógeno y el hospedero. Un punto fundamental es que el patógeno debe tener un efecto rápido de entrada con la mínima degradación de la pared celular del hospedero. Esta estrategia puede ser crítica para una infección exitosa porque fragmentos de la pared celular de la planta actúan como evocadores de la respuesta de defensa del hospedero (Dixon y Lamb, 1990).

### **Colonización**

Esta fase involucra el crecimiento y reproducción del patógeno. Los hongos y las plantas superiores parasitarias generalmente invaden e infectan los tejidos por su crecimiento en uno de los puntos iniciales de inoculación. Muchos de estos patógenos, producen una pequeña mancha, una larga área infectada o una necrosis general en la planta, continúan creciendo y extendiéndose con la infección en el hospedero indefinidamente, así que el mismo patógeno individual continúa extendiéndose en más y más tejidos de la planta hasta que la propagación de la infección es detenida o la planta se muere. Todos los otros patógenos, ya sean bacterias, virus, nemátodos o protozoarios invaden e infectan tejidos nuevos dentro de la planta por reproducción a una velocidad rápida e incrementan su número enormemente en los tejidos infectados. La progenie puede ser llevada pasivamente hacia nuevas células y tejidos a través de los plasmodesmata (sólo virus y viroides), polen (virus, viroides, algunas bacterias exigentes y protozoarios) o el xilema (algunas bacterias). Los patógenos de las plantas se reproducen en una variedad de formas (ver Figura 1). Los hongos se reproducen por medio de esporas, que puede ser por vía sexual o asexual. Las plantas superiores parasitarias se reproducen justo igual que todas las plantas, por semillas. Las bacterias y protozoarios se reproducen por fisión. Los virus y viroides son replicados por la célula, utilizando la maquinaria de la célula huésped y finalmente los nemátodos se reproducen por medio de huevos.



**Figura 1.** Morfología y multiplicación de algunos de los grupos de patógenos de las plantas (Agrios,1997).

La gran mayoría de los patógenos micóticos de la planta producen su micelio sólo cuando han infectado la planta. Relativamente pocos son los que lo producen en la superficie de la planta huésped. La gran mayoría de los hongos producen esporas en o justo por debajo de la superficie del área infectada del hospedero, y las esporas son liberadas hacia fuera de su ambiente.

Las plantas superiores parasitarias producen sus semillas en extensiones aéreas, y algunos nemátodos colocan sus huevos en o cerca de la superficie de la planta hospedera. Las bacterias se reproducen entre o dentro de las células hospederas generalmente dentro de la planta y llegan a su superficie sólo a través de heridas, grietas o del estoma. Los virus, viroides, protozoarios y bacterias exigentes sólo se reproducen en el interior de la célula y aparentemente no se localizan o existen en la superficie de la planta hospedera. El grado de reproducción varía considerablemente entre los diversos tipos de patógenos (Agrios, 1997).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**B) PRODUCTOS SECUNDARIOS DEL PATOGENO.**

Los metabolitos secundarios de origen microbiano corresponden a sustancias de naturaleza química variable, formadas usualmente en la fase tardía de su crecimiento por unas cuantas especies biológicas. A diferencia de los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios presentan dificultad para ser integrados a la fisiología general del microorganismo que los produce, con frecuencia se les considera como productos no esenciales para el crecimiento vegetativo del microorganismo productor. Sin embargo, se les ha concedido una ventaja competitiva para aquellos sistemas biológicos que los forman. Como ejemplos de productos secundarios podemos citar a los pigmentos microbianos, diversas hormonas vegetales, toxinas y los antibióticos.

La formación de metabolitos secundarios es característica de diversas especies de bacterias, hongos, plantas e invertebrados.

Los actinomicetales son los que producen el mayor porcentaje de los mismos. Entre bacterias productoras están algunas especies de *Bacillus*, *Pseudomonas* y flavobacterias. Dentro de los hongos capaces de producir destacan los géneros *Penicillium*, *Dacrymyces*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Santana *et al.*, 1994).

Muchas especies de *Fusarium* producen un número de metabolitos secundarios que causan diferentes respuestas fisiológicas y farmacológicas en plantas y animales (Nelson, 1993).

El inicio del metabolismo secundario muchas veces puede correlacionarse con condiciones nutricionales que imitan el crecimiento.

Es importante hacer una distinción entre actividad y función de un metabolito secundario. La actividad biológica es una propiedad intrínseca de la molécula, que en el organismo productor puede cumplir con una función; sin embargo, la mayoría no necesariamente cumple con una función en el organismo productor y puede tener una función diferente en el organismo receptor (Santana *et al.*, 1994).

### C) TOXINAS.

En la patología de la planta, las toxinas son descritas como sustancias que son usualmente metabolitos microbianos que son perjudiciales para las plantas a muy bajas concentraciones. En algunos casos, especialmente si son producidos durante las etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad, estos componentes tienen una función en la patogénesis y reproducen algo o hasta todos los síntomas de la enfermedad causada por el organismo productor (Graniti, 1991).

#### **Toxinas bacterianas**

Muchas especies de bacterias fitopatogénicas producen toxinas que parecen tener una función en el desarrollo de la enfermedad, éstas pueden afectar a la planta de manera diferente y el resultado final puede ser el desarrollo de clorosis, necrosis, ablandamiento, anomalías del crecimiento o marchitamiento.

Entre las fitotoxinas producidas por bacterias, destacan:

Coronatina. Esta toxina es sintetizada por varias subespecies de *P. syringae* entre éstas *atropurpurea*, *tomato*, *glycinea*, *maculicola* y *morsprunorum*, ocasionando clorosis en la planta.

Faseolotoxina. Se ha encontrado que esta toxina inhibe específicamente a la enzima ornitina carbamoiltransferasa (OCTasa) del ciclo de la ornitina, siendo un inhibidor irreversible. La inhibición de la OCTasa puede estar vinculada con la clorosis de varias formas, como son, una reducción en la síntesis de proteínas debido a la deficiencia de arginina, o por una depresión en la síntesis de pirimidina debido a una deficiencia de citrulina que es la que disminuye los niveles de carbamoilaspartato.

Rizobitoxina. Fue aislada originalmente de algunas cepas de *Bradyrhizobium* (*Rhizobium*) *japonicum* que causa clorosis apical en semilla de soya, esta toxina ha sido también identificada como un producto de *Pseudomonas andropogonis*, causante del maíz rayado. Se ha encontrado que esta toxina inhibe la síntesis de metionina, bloqueando así la conversión de metionina a etileno.

Tabtoxina- $\beta$ -lactámica. Es producida por una serie de subespecies de *P. syringae* que inducen halos cloróticos alrededor de centros necróticos. Dependiendo de la cepa del patógeno, puede producir solo el dipéptido, que es la forma protoxina, llamada trivialmente tabtoxina, la cual es enzimáticamente hidrolizada al entrar en la célula

hospedera a tabtoxinina- $\beta$ -lactámica. la tabtoxina no tiene actividad biológica. siendo la tabtoxinina- $\beta$ -lactámica la forma activa de la toxina.

Algunos descubrimientos han sido significativos para el entendimiento del modo de acción de esta toxina: a) para el desarrollo de clorosis se requiere luz. b) la acumulación de amoniaco como el desarrollo de clorosis, c) la glutamina puede ser protector de la clorosis y d) la sulfoximina de metionina (MSO) inhibe la sintetasa de glutamina (GS). Estos descubrimientos fueron de gran ayuda para demostrar que la tabtoxinina- $\beta$ -lactámica es un inhibidor irreversible de la GS.

Tagetitoxina. Es producida por *P. syringae* pv. *tagetis*. La clorosis que causa es muy característica y tal vez se confina exclusivamente a los meristemos apicales del hospedero. La frecuencia apical es el resultado de la translocación de las lesiones primarias de la toxina hacia los ápices y porque el estado metabólico del desarrollo de los cloroplastos es particularmente sensible a la toxina. Ultraestructuralmente, parece ser que el cloroplasto es el único organelo afectado por esta toxina y que probablemente su sitio de acción sea la RNA polimerasa del cloroplasto.

Entre aquellas fitotoxinas que producen anomalías en el crecimiento, podemos mencionar las citoquininas, la producción de etileno y el ácido indol acético, de los cuales se desconoce su mecanismo de acción, y actúan de manera similar a las hormonas.

Siringomicina. Es una toxina producida por varias cepas de *P. syringae* pv. *syringae* que causa necrosis en diversas plantas. Estudios realizados han encontrado que la siringomicina (SR) afecta el proceso de transporte de iones causando un efecto sobre la integridad de la membrana (Durbin, 1991); altera el potencial eléctrico y el flujo de  $Ca^{2+}$  y  $K^{+}$  a través de la membrana plasmática. SR estimula *in vitro* a la  $H^{+}$ -ATPasa de la membrana plasmática del tejido almacenado de la levadura *Rhodotorula pillmanae* y del betabel rojo (*Beta vulgaris* L.). También estimula la fosforilación dependiente de  $Ca^{2+}$  de varias proteínas de la membrana plasmática del tejido almacenado del betabel rojo. SR puede estar activando proteínas cinasas que fosforilan y modulando la actividad de  $H^{+}$ -ATPasa, a través de una inhibición de la desfosforilación de la proteína (Suzuki *et al.*, 1992).

Siringotoxina. Es producida por cepas de *P. syringae* pv. *syringae* que causan necrosis en *Citrus* sp; se parece mucho biológicamente a la siringomicina, pero difiere en su composición química. Se desconoce su modo de acción.

Polisacáridos extracelulares. La química de este grupo está poco entendida, porque consiste de una mezcla de sustancias complicadas estructuralmente y de alto peso molecular. Se han estudiado mucho con *P. syringae* pv. *phaseolicola*, siendo los componentes principales de los polisacáridos extracelulares (EPS) el alginato y el fructano. Causan ablandamiento en diversas plantas.

De las toxinas que ocasionan marchitamiento, éstas actúan primeramente cambiando el potencial de agua extracelular, afectando ya sea la función estomatal o incrementado la resistencia al flujo de agua (Durbin, 1991).

#### **Micotoxinas**

El estudio de las toxinas micóticas en la patogénesis de la planta ha tenido un extraordinario progreso durante la última década.

Se definen como micotoxinas a los metabolitos micóticos de bajo peso molecular (Desjardins y Hohn, 1997) que son dañinos para humanos y animales. Las micotoxicosis son enfermedades causadas por la ingestión de alimentos o comida contaminados con estos metabolitos (Nelson, 1993). Una amplia variedad de los metabolitos micóticos son tanto micotóxicos (tóxicos en animales) y fitotóxicos (tóxicos para plantas) (Desjardins y Hohn, 1997). Entre las micotoxinas más relevantes podemos mencionar:

Acido fusárico. Es bien sabido que es una fitotoxina, pero generalmente se le considera como micotoxina. Es un agente quelante y puede estar implicado seguramente en enfermedades donde existe un desarrollo anormal del hueso en animales (Nelson *et al.*, 1984).

Aflatoxinas. Son producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*, mientras que una amplia variedad de *Aspergillus* sp. producen al precursor de las aflatoxinas que es la esterigmatocistina, que es tóxica y cancerígeno en animales.

Alcaloides Ergot. La más conocida micotoxicosis en la historia humana es el ergotismo, que es causado por el consumo de grano, usualmente centeno, contaminado con esclerocios de *Claviceps purpurea*. Actualmente es raro que se presente en la población humana debido a los nuevos procedimientos de limpieza del grano, donde es removida la esclerocia.

La esclerocia contiene una mezcla compleja de alcaloides biológicamente activos, que son la principal causa del envenenamiento por ergot. Los alcaloides ergot representan

una larga familia de micotoxinas que son derivadas de aminoácidos y precursores de isoprenoides, e incluyen clavinas, derivados simples del ácido lisérgico, y ergopeptinas que son complejos estructurales tales como la ergotamina (Desjardins y Hohn, 1997).

Brefeldina A. Fue aislada originalmente de la cepa de *Penicillium decumbens* y nombrada decumbina, es un metabolito activo biológicamente de un amplio rango de hongos.

Cercosporina. Fue primeramente aislada del patógeno de las semillas de soya *Cercospora kikuchii*, es una toxina no selectiva y se ha considerado que está implicada junto con la toxina de *Cercospora beticola* en la enfermedad del betabel dulce, así como con otras enfermedades de las plantas. Se ha observado que la cercosporina mata las células de la planta rápidamente sólo en presencia de luz, evidenciando que su toxicidad puede ser relacionada a propiedades fotodinámicas. La cercosporina en presencia de luz produce especies reactivas de oxígeno, siendo probablemente responsables de la peroxidación lipídica observada *in vitro* e *in vivo* y consecuentemente del daño membranal observado en las células de la planta (Ballio, 1991; Simon-Plas *et al.*, 1996).

Fusicocina. Es el metabolito fitotóxico más relevante de *Fusicoccum amygdali*, el agente causal de cáncer en almendra y durazno. Las hojas marchitadas son debido a la toxina pura del patógeno, que induce la apertura del estoma y consecuentemente debilita el balance del agua en la planta. Se ha encontrado que la fusicocina actúa primero y directamente a nivel de membrana plasmática, donde activa selectivamente la H<sup>+</sup>-ATPasa a través de la integración de la toxina con la proteína 14-3-3 (Ballio, 1991; Oecking *et al.*, 1997; Roberts y Bowles, 1999).

Ofiobolinas. La ofiobolina A es la primera fitotoxina descubierta de este grupo, su precursor biogénico inmediato es la ofiobolina B que contiene cuatro átomos de hidrógeno de más. El probable papel que desempeña la ofiobolina A es en el desarrollo de las manchas café en el arroz, siendo esto sustentado por la presencia de *Cochliobolus miyabeanus* en las hojas de arroz infectado. Además, se ha demostrado que *in vitro* la ofiobolina A inhibe irreversiblemente la calmodulina del cerebro de bovino, del maíz y de la espinaca, lo que hace pensar que éste puede ser el blanco molecular de las ofiobolinas.

Beticolina Es el metabolito fitotóxico de mayor importancia del hongo *Cercospora beticola*, causa puntos en las hojas del betabel dulce. Exhibe actividad antibiótica contra

bacterias e induce lesiones necróticas características de las manchas en las hojas. Se ha descrito que esta toxina afecta a la ATPasa de la membrana plasmática. El bombeo de protones en vesículas microsomales es inhibido a bajas concentraciones de la toxina en tallos de chícharo y en raíces de maíz (Ballio, 1991).

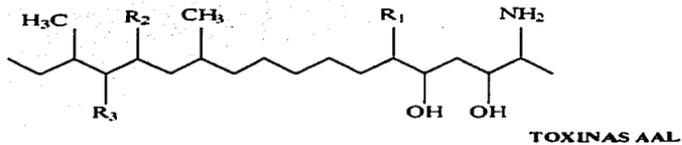
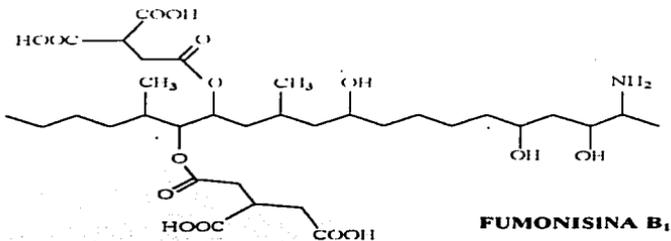
**Tricotecenos.** Por más de 100 años, las micotoxicosis crónica y aguda en humanos y animales de granja han sido asociados con el consumo de trigo, centeno, cebada, avena, arroz y maíz contaminado con *Fusarium* sp. El cual produce toxinas tricotecenos. Los tricotecenos constituyen una larga familia de epóxidos de sesquiterpenos que inhiben la síntesis de proteínas en eucariontes. La biosíntesis de los tricotecenos por *Fusarium* sp. procede del tricodieno hidrocarbonado a través de una serie compleja de pasos, entre los intermediarios tenemos al diacetociscirpenol, deoxinivalenol y la toxina T-2.

Los tricotecenos afectan un amplio rango de las especies de plantas. La aguda fitotoxicidad de los tricotecenos y su incidencia en los tejidos de la planta sugieren que estas micotoxinas juegan un papel en la patogénesis de *Fusarium* sp en la planta (Desjardins y Hohn, 1997).

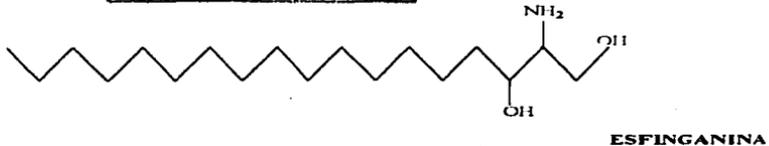
#### D) FUMONISINA B<sub>1</sub>.

*Fusarium moniliforme* es uno de los hongos más predominantemente asociado con la dieta básica humana y animal ya que infecta granos comestibles como el maíz. Las toxinas producidas por este hongo, son ácido fusárico, giberelinas, moniliforminas y fumonisinas. Las fumonisinas son producidas más a menudo cuando *Fusarium moniliforme* crece en el maíz (Nelson, 1992).

La estructura de las fumonisinas fue primeramente reportada por un grupo de investigadores del sur de África en 1988, su descubrimiento es el resultado de una década de investigación para una posible causa de la alta incidencia de cáncer esofágico en la región de Transkei al sur de este continente. El componente más activo en cultivos de maíz con *F. moniliforme* MRC 826 fue nombrado fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) y se presentó como un diéster del ácido propano-1, 2, 3-tricarboxílico y un 2-amino-12, 16-dimetil-3, 5, 10, 14, 15-pentahidroxiicosano con los OH de los carbono 14 y 15 esterificados con el COOH terminal de los ácidos y cuya estructura se muestra en la Figura 2 (Gelderblom *et al.*, 1988).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**FIGURA 2:** Fórmula estructural de la Fumonisin B<sub>1</sub>, Toxinas AAL y Esfinganina (Nelson, 1993 y Abbas *et al.*, 1992).

Además de la fumonisina B<sub>1</sub>, se han reportado fumonisinas homólogas, como son la fumonisina B<sub>2</sub> y la fumonisina B<sub>3</sub>, que carecen de uno de los grupos hidroxilos libres del esqueleto hidrocarbonado. La fumonisina B<sub>2</sub> en el C-10 mientras que la fumonisina B<sub>3</sub> en el C-5. Estas tres fumonisinas son las que más se presentan en muestras de maíz contaminado naturalmente.

Algunas muestras de maíz contienen pequeñas cantidades de fumonisina B<sub>4</sub>, la cual carece de grupos hidroxilo en el C-5 y C-10. Un análogo adicional, es la fumonisina C<sub>1</sub>, la cual tiene los mismos sustituyentes que la fumonisina B<sub>1</sub>, pero su peso molecular es 14 daltones menor que la FB<sub>1</sub> por carecer del grupo metilo en el C-1.

La fumonisina B<sub>1</sub> fue identificada como una nueva clase de micotoxina, cuya estructura es notablemente similar a la toxina AAL, la cual es un monoéster del ácido propano-1, 2, 3-tricarboxílico y 2, 4, 5, 13, 14-pentahidroxihéptadecano. La toxina AAL es una fitotoxina producida por *Alternaria alternata* que juega un papel importante en la patogénesis del jitomate (Nelson, 1993).

La similitud de la estructura de la fumonisina con las cadenas largas de las bases esfingolípidas en células animales sugiere que la biosíntesis de las fumonisinas puede ser similar a la de la biosíntesis de los esfingolípidos (Desjardins y Hohn, 1997).

Se han realizado varios estudios acerca de cómo la FB<sub>1</sub> parece alterar la actividad celular normal del metabolismo endógeno de las bases esfingolípidas, y se ha encontrado que es un potente inhibidor de la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos *in vitro*, siendo su blanco principal la esfinganina *N*-aciltransferasa. Esta inhibición resulta en una disminución de la biosíntesis de esfingosina y una acumulación de esfinganina libre, que es un intermediario en la vía de síntesis *de novo* para los esfingolípidos (Riley *et al.*, 1994; Aboas *et al.*, 1994) siendo estos compuestos tóxicos para las células del hospedero.

Por otro lado, entre los efectos de la fumonisina B<sub>1</sub>, recientemente se le ha asociado con la incidencia de cáncer esofágico en humanos. Cuando se ha inducido el crecimiento de este hongo en el maíz y ha sido suministrado como alimento en animales experimentales, se ha encontrado la inducción de lesiones que incluyen cirrosis e hiperplasia nodular en el hígado y trombosis cardíaca intraventricular en ratas, leucoencefalomalacia en caballos, edema pulmonar en cerdos, nefrosis y hepatosis en ovejas y falla congestiva aguda en el corazón de mandriles (Nelson, 1993).

**Tabla I. Efecto de la fumonisina B<sub>1</sub> en plantas**

Especie	Dosis	Efectos Macroscópicos	Efectos celulares o Moleculares
Lenteja de agua ( <i>Lemna minor</i> )	0.7 µg/mL (1 µM)	Reducción general del crecimiento	Reducción en la capacidad de sintetizar Clorofila
Maíz ( <i>Zea mays</i> )	1-100 ppm (1.3-130 µM)	Reducción del crecimiento de la raíz y de los retoños. Podredumbre de raíz (planta adulta)	Inhibición de la ATPasa de H <sup>+</sup> . Degradación del DNA. Aumento de la actividad de la Glucan sintetasa II. Modificación de los niveles de RNAm de quitinasa, y proteínas ricas en hidroxiprolina.
Toloache ( <i>Datura stramonium</i> )	2.5 µg/100 µL (32.5 µM)	Podredumbre de hojas expuestas a la toxina. Manchas de necrosis y clorosis. Muerte general de la planta.	Alteración estructural del citoplasma y cloroplasto. Reducción de clorofila. Fuga de electrolitos.
Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	5-70 µM	Zonas de necrosis en hojas.	Inducción de la apoptosis. Incremento en bases esfingoides. Aumento en la fuga de electrolitos.
Lenteja acuática ( <i>Lemna paucicostata</i> )	5-70 µM	No descrito	Incremento en bases esfingoides. Aumento en fuga de electrolitos.
Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	5-70 µM	No descrito	Incremento en bases esfingoides. Aumento en fuga de electrolitos.

Tomado de Gutiérrez-Najera *et al.*, 2003.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En cuanto al papel que desempeña en la patogénesis de las plantas, se ha demostrado que las fumonisinas causan emblanquecimiento en hojas, necrosis, inhibición del crecimiento y muerte en algunas especies como en plantas de toloache intactas, donde también se observó un trastorno del cloroplasto y el citoplasma en presencia de luz (Abbas *et al.*, 1992); en semillas de maíz la fumonisina B<sub>1</sub> presenta claros efectos fitotóxicos sobre su crecimiento, inhibiendo la elongación de la radícula hasta en un 75% después de 48 horas de imbibición, así como una inhibición de la producción de enzimas de la amilasa (Doehler *et al.*, 1994), también se ha encontrado que induce la pudrición en tallo y espiga de maíz (Nelson, 1992). La Tabla I muestra los efectos de la fumonisina B<sub>1</sub> en algunas especies de plantas.

### **E) MECANISMOS DE DEFENSA DE LA CELULA DE LA PLANTA ANTE EL ATAQUE DEL PATOGENO.**

Las plantas son constantemente desafiadas por patógenos pero el desarrollo de la enfermedad es poco común. ¿Por qué? En general, existen tres razones por las que el patógeno fracasa. (1) La planta es incapaz de mantener los requerimientos del lugar del patógeno potencial y se le considera no-hospedera; o (2) La planta posee barreras estructurales o componentes tóxicos preformados inducidos por especies de patógenos especializados a través de infecciones exitosas; o (3) Una vez que se da el reconocimiento al ataque del patógeno, son elaborados mecanismos de defensa y la invasión permanece localizada y eventualmente, controlada.

Se ha hipotetizado que el reconocimiento de razas específicas de patógenos es el resultado de una interacción directa o indirecta del producto del gen de resistencia de la planta semidominante o dominante (R) con el producto derivado del correspondiente gen de avirulencia del patógeno dominante (*A<sub>vr</sub>*) (Hammond-Kosack y Jones, 1996), siendo éste el concepto de "gen por gen". Esto es, la resistencia o susceptibilidad en cultivos hospederos para distintas razas fisiológicas de patógenos está determinada por pares de genes que se corresponden entre el hospedero y el patógeno. En tales interacciones "gen por gen", el gen de resistencia en un cultivo de hospedero en particular le confiere resistencia contra razas fisiológicas de patógenos que expresan el gen de avirulencia; esto lleva a una incompatibilidad genética caracterizada por una

respuesta hipersensible (HR), que implica una muerte rápida de las primeras células infectadas y la elaboración subsecuente de una variedad de defensas inducibles (Dixon y Lamb, 1990).

La primera línea de defensa de la planta contra los patógenos es su superficie, ya que de penetrar a la planta puede sobrevenir la infección. Algunas de las defensas estructurales presentes en la planta, incluyen a las ceras y cutícula que cubren las células epidermales, la estructura de la pared celular epidermal, el tamaño, localización, y la forma de los estomas y lenticelas.

El reconocimiento temprano del patógeno por la planta es muy importante, la planta aparentemente recibe moléculas señales, que son, moléculas que le indican la presencia del patógeno, tan pronto como el patógeno establece contacto físico con la planta. Algunos patógenos, especialmente hongos y bacterias, liberan a su medio inmediato una variedad de sustancias tales como glicoproteínas, carbohidratos, ácidos grasos y péptidos. En algunas combinaciones patógeno-hospedero, ciertas de estas sustancias actúan como evocadores (Agrios, 1997), que son moléculas que se originan ya sea en el patógeno o en el hospedero y que pueden inducir respuestas de defensa en el tejido de la planta; en el caso de los evocadores del patógeno, existe una implicación de que el evocador probablemente ejerza su efecto de activación por una interacción con un receptor similar en la planta (Dixon y Lamb, 1990).

Se conoce poco acerca de la localización de estos receptores en el hospedero, pero por algunos estudios, parece que existen ya sea fuera o en la membrana celular, mientras que otros aparentemente se encuentran intracelularmente. Una vez que la molécula particular de la planta reconoce y reacciona con el evocador derivado del patógeno, se asume que la planta ha reconocido al patógeno. Siguiendo este reconocimiento, una serie de reacciones bioquímicas y cambios estructurales se llevan a cabo en las células de la planta en un esfuerzo por rechazar al patógeno y sus enzimas, toxinas, etc. Como rápidamente la planta reconoce la presencia del patógeno y puede enviar mensajes de alarma eficientemente para organizar su defensa, estos procesos determinarán si la infección se llevará a cabo o cuánto podrá desarrollarse el patógeno, qué tan severos serán los síntomas (manchas en las hojas, tallo, frutas, ó lesiones en la raíz), etc.

Entre las defensas estructurales inducidas por la planta, que se dan en respuesta al ataque por patógenos, están las reacciones de defensa citoplásmicas, en las que están

implicadas enzimas del citoplasma: otras, por las estructuras de defensa de la pared celular que implican sus cambios morfológicos o cambios derivados en la pared celular de la célula que está siendo invadida por el patógeno. De éstas últimas se han encontrado tres principales tipos de estructuras observadas en algunas enfermedades de las plantas.

(1) La capa exterior de la pared celular de las células del parénquima que al entrar en contacto con el patógeno producen un material fibrilar y amorfo que rodea y atrapa al patógeno previniendo su multiplicación. (2) Engrosamiento de la pared celular en respuesta a varios patógenos por la de material celulosítico: sin embargo, este material es a menudo infundido con sustancias fenólicas que se entrecruzan e incrementan la resistencia a la penetración. (3) Papilas de callosa que se depositan en el lado interior de la pared celular en respuesta a la invasión por patógenos micóticos.

Finalmente, la muerte de la célula invadida puede proteger a la planta de invasiones evitando la diseminación de la enfermedad a otras áreas sanas del tejido, lo que se llama reacción de defensa hipersensible o necrótica (Agrios, 1997).

### **Respuesta hipersensible.**

La respuesta hipersensible o de hipersensibilidad (HR) está definida como la muerte de la célula hospedera dentro de pocas horas de contacto con el patógeno. Se ha propuesto que la HR juega un papel causal en la resistencia a la enfermedad. La HR puede causar la detención del patógeno y también puede ocurrir como consecuencia de la activación de otras respuestas de defensa.

Evidencia reciente sugiere que ocurren dos tipos de procesos de muerte celular en ambas interacciones patógeno planta: compatibles e incompatibles (Hammond-Kosack y Jones, 1996) (éste último término se refiere a que el patógeno fracasa al infectar al huésped como se mencionó anteriormente) (Agrios, 1997). Estos procesos pueden ser (a) la muerte se produce porque hay un cambio en una vía bioquímica del metabolismo celular que produce la formación de componentes o radicales libres que son tóxicos para ambos, planta y patógeno, causando más tarde la rápida necrosis, ó (b) el reconocimiento del patógeno cambia el ataque de la célula de la planta en una muerte celular genéticamente programada o respuesta apoptótica.

### Especies reactivas de oxígeno.

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) probablemente juega un papel clave en la defensa de la planta. Entre las especies reactivas de oxígeno se incluyen el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxiperoxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ). En estudios recientes que implican cultivos celulares de plantas, se ha observado que las plantas contienen un mecanismo de producción de  $O_2^{\cdot-}$  que implica a la oxidasa NADPH análoga a la usada por neutrófilos en mamíferos. El  $O_2^{\cdot-}$  generado es usualmente dismutado rápidamente, ya sea vía la superóxido dismutasa (SOD) o no enzimáticamente vía la catálisis del peróxido de hidrógeno, cuya acumulación puede ser detectada en la mayoría de los sistemas de plantas. La vida media del  $O_2^{\cdot-}$  es de  $< 1$  seg. Debido a que el  $H_2O_2$  no tiene electrones desapareados, puede cruzar las membranas biológicas, mientras que el anión superóxido debido a su carga puede hacerlo, aunque muy lentamente.

Ambos  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  son moderadamente reactivos: sin embargo, el daño celular por los ROS parece deberse a su conversión en más especies reactivas. La protonación del  $O_2^{\cdot-}$  ocurre más fácilmente a bajo pH, con la producción del radical hidroxiperoxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ). Debido a que el  $HO_2^{\cdot}$  es menos polar que el  $O_2^{\cdot-}$ , tiene más capacidad de atravesar las membranas biológicas más o menos tan efectivamente como lo hace el peróxido de hidrógeno. A diferencia del  $O_2^{\cdot-}$ , el  $HO_2^{\cdot}$  puede atacar los ácidos grasos directamente y ha sido demostrado que convierte los ácidos linoléico, linoleico y araquidónico en sus formas peroxidadas. De esta manera, bajo condiciones apropiadas, la generación de  $O_2^{\cdot-}$  y principalmente la formación de  $HO_2^{\cdot}$ , resulta en un daño estructural a la membrana que se traduce en una mayor permeabilidad y además en la producción de moléculas señales de peróxido de lípidos potenciales.

En presencia de  $Fe^{2+}$ , el  $H_2O_2$  puede sufrir la reacción de Fenton que da lugar al radical libre hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) que es extremadamente destructivo, y que puede iniciar la peroxidación lipídica indefinidamente. Si el  $H_2O_2$  entra en el citoplasma y sobrevive en suficientes concentraciones para llegar ya sea al núcleo celular de la planta o del patógeno, puede reaccionar con iones metálicos intracelulares generando  $OH^{\cdot}$ , mismos que se sabe fragmentan el ADN en sitios específicos de ataque. Así que la producción de ROS resulta en un daño considerable para ambos patógeno y huésped y requiere que

las células de la planta activen la formación de mecanismos protectores (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

En plantas, las principales enzimas antioxidantes a nivel citosol/membrana plasmática son la catalasa y la superóxido dismutasa, las cuales reaccionan con las formas activas de oxígeno, y la ascorbato peroxidasa y la glutatión reductasa, que regeneran la oxidación de los antioxidantes (Vera-Estrella *et al.*, 1994II).

Han sido propuestos varios papeles para los ROS en la defensa de la planta. Por ejemplo, el  $H_2O_2$  puede ser directamente tóxico para los microorganismos a los niveles que se conoce que son producidos en las plantas, puede contribuir con el reforzamiento estructural de la pared celular de la planta, y es esencial para la formación del polímero lignina, precursor en la vía de la peroxidasa.

Es también probable un papel de señalamiento para algunos ROS. El  $H_2O_2$  incrementa la actividad de la enzima ácido benzoico-2 hidroxilasa (BA2-H), que se requiere para la biosíntesis del ácido salicílico (SA). Además, el peróxido de hidrógeno activa algunos mecanismos de protección, por ejemplo, la expresión del gen de la glutatión-S-transferasa (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

#### **Fortificación de la pared celular.**

La cantidad de sustancias defensivas producidas o depositadas en la pared celular de las plantas cuando son invadidas por hongos son callosa, glicoproteínas, por ejemplo extensinas que son ricas en el aminoácido hidroxiprolina, componentes fenólicos de complejidad variable incluyendo lignina y suberina, y elementos minerales tales como el calcio (Agris, 1997). Un tipo de fortificación de la pared celular que ocurre rápidamente en respuesta a la invasión micótica es la formación de la papila. La papila se forma a menudo inmediatamente por debajo del gancho de penetración y su composición es heterogénea, se piensa que es un bloqueador físico en la penetración micótica de las células hospederas.

La rápida deposición de callosa en la pared celular es también frecuentemente asociada con los sitios de incompatibilidad del patógeno. La deposición de callosa también sucede cuando cultivos celulares de plantas son estimulados con evocadores derivados de patógenos o cuando el tejido de la planta es herido mecánicamente. La enzima sintetasa de callosa (GS-II) es constitutiva de la membrana plasmática y para catalizar la

formación de este polímero  $\beta$ -1,3-glucano requiere el incremento de ambos niveles de  $\beta$ -furfuril- $\beta$ -glucósido y  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad. El bloqueo del plasmodesmata con callosa es un componente esencial de la respuesta de defensa que se requiere para impedir el traslado de virus entre célula y célula.

De las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) se piensa que juegan un papel clave en la organización de la arquitectura de la pared celular primaria y pueden actuar como foco para la iniciación de la polimerización de lignina. Las extensinas son capaces de inmovilizar ciertos patógenos de la planta, posiblemente a través de interacciones electrostáticas. Un mecanismo adicional aunque probablemente lento que hace la pared celular más impermeable es la elevación local del contenido de lignina.

#### **Ácido benzóico y ácido salicílico.**

Algunos patógenos incompatibles, tales como hongos, virus, o bacterias, frecuentemente provocan la acumulación tanto del ácido benzóico (BA), ácido salicílico (SA) y sus respectivos conjugados de glucósido, con la formación de altas concentraciones en las inmediatas vecindades del sitio de infección. La inducción de estos componentes está comúnmente asociada con la respuesta hipersensible (HR). La principal vía bioquímica para la biosíntesis del SA está relativamente bien establecida, pero su regulación puede ser diferente entre especies de plantas.

En la liberación del ácido benzóico a partir de un conjugado de BA preformado, se induce una citocromo P<sub>450</sub> monooxigenasa (BA2-H) soluble que convierte el BA en SA. La actividad de la enzima BA2-H es fuertemente inducida antes de la aparición de la HR.

No está claro si la biosíntesis de SA es una causa o una consecuencia de HR, pero ambas hipótesis pueden ser válidas. Han sido propuestos varios otros papeles para el SA y/o BA en la defensa de la planta. Ambos compuestos pueden ser directamente antimicrobiales. Los niveles elevados de SA pueden también inhibir la expresión de genes inducidos en heridas por bloqueo de la biosíntesis del ácido jasmónico (JA); un absoluto requerimiento para el SA es la resistencia mediada por el gen R contra varios hongos, bacterias y virus.

Está claro que el papel del ácido salicílico en la defensa es complejo y también puede diferir de especie a especie (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

**Proteínas relacionadas con la defensa.**

Las proteínas relacionadas con la patogénesis, a menudo llamadas proteínas PR, son un grupo de proteínas de la planta, estructuralmente diversas, que son tóxicas para los patógenos invasores.

Las PR existen en la parte extracelular de las células de la planta y también en espacios intracelulares. Las PR pueden ser tanto extremadamente ácidas como extremadamente básicas y por lo tanto son altamente solubles y reactivas. Las proteínas PR mejor conocidas son proteínas PR1,  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas, lisozimas, proteínas PR4, proteínas ricas en cisteína, proteínas ricas en glicina, inhibidores de proteinasas, proteinasas, quitosanasas y peroxidadas.

Aunque las plantas saludables pueden contener cantidades trazas de varias proteínas PR, el ataque por patógenos, el tratamiento con evocadores, heridas, o el estrés, inducen la transcripción de una batería de genes que codifican para estas proteínas. Entre los componentes señales responsables de la inducción de las proteínas PR se incluyen el ácido salicílico, etileno, xilanasas, ácido jasmónico y probablemente otros (Agrios, 1997).

**Lipoxigenasas.**

El incremento rápido en la actividad de la enzima lipoxigenasa (LOX) ha sido encontrado frecuentemente asociado con la incompatibilidad mediada por el gen *R-Avr*: tal incremento en su actividad puede contribuir a la resistencia de un número de vías. Por ejemplo, LOX puede generar moléculas señales tales como el ácido jasmónico (JA), JA-metil, o peróxidos de lípido, que coordinadamente amplifican respuestas específicas. La actividad de LOX puede causar además un daño irreversible en la membrana, que puede ser principalmente la pérdida del contenido celular y resultando finalmente en la muerte celular de la planta. Alternativamente, las reacciones catalizadas por LOX pueden resultar en la producción de metabolitos secundarios tóxicos volátiles y no volátiles derivados de ácidos grasos que atacan directamente a los patógenos invasores (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

**Fitoalexinas.**

Son sustancias tóxicas antimicrobianas que son producidas en cantidades apreciables en las plantas sólo después de ser estimuladas por diversos tipos de microorganismos fitopatogénicos, por daño químico o mecánico (Agrios, 1997).

Las fitoalexinas son de bajo peso molecular, lipofílicas, que se acumulan rápidamente alrededor de los sitios de infección y se dan en respuesta a estimulación por evocadores bióticos y abióticos.

Debido a que la biosíntesis de la mayoría de las fitoalexinas requiere de la actividad de numerosas enzimas, se requiere de gran coordinación en los eventos señales durante el ataque de las células para obtener una respuesta de defensa exitosa (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

Algunas de las fitoalexinas mejor estudiadas incluyen la faseolina en frijol, pisatina en la pera, gliseolina en la soya, alfalfa, y trébol, risitina en papa, gopisol en algodón, y capsidiol en pepino (Agrios, 1997).

**F) SISTEMAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES.**

Todas las células tienen mecanismos de señales que les permiten percibir cambios en su medio ambiente ante los cuales tienen que reaccionar. Estos cambios son procesados como señales (Nelson y Cox, 2000). Tanto las células procarióticas como eucarióticas han desarrollado componentes moleculares que se asocian de manera ordenada, específica y secuencial y que forman vías de recepción de la señal (primer mensajero), su transmisión intracelular y la salida de respuesta a la señal. Cada vía puede estar conformada por varias proteínas, enzimas y componentes específicos. En la gran mayoría de los casos no se conocen todos ellos y además estos varían dependiendo del tipo de señal que se perciba. Sin embargo, la estrategia es común: Hay un receptor (membranal en la mayoría de los casos) que existe en un número reducido de copias y que interactúa de manera específica con la señal externa. Este receptor a su vez activa varias copias de una molécula efectora primaria y cada una de éstas a su vez activa varias más, produciéndose así una respuesta amplificadas a la señal (por lo que se denominan cascadas de señalización). El número de efectores secuenciales es variable dependiendo del estímulo. Algunos de los efectores pueden producir moléculas en gran cantidad pero de manera regulada y éstos son los llamados segundos mensajeros que

activan a otras moléculas amplificando así la señal originalmente percibida. Otros más de los últimos efectores son a menudo factores de transcripción de genes específicos cuya expresión tiene que ser aumentada porque el producto proteico respectivo es necesario para dar respuesta a la señal (Schaller y Oecking, 1999). Los mecanismos de transducción de señales son altamente sensibles, específicos y han sido conservados durante la evolución. En las células eucarióticas existen cuatro mecanismos generales de señalamiento: (1) canales de iones en la membrana plasmática; (2) enzimas con un dominio catalítico dentro de la célula y un receptor extracelular para la señal; (3) proteínas membranales que estimulan proteínas blanco (enzimas o canales de iones) por activación de proteínas G y (4) proteínas nucleares que ligan esteroides y actúan como factores transcripcionales. A continuación se reseñan los componentes más importantes o mejor conocidos de vías de transducción de señales.

### **Receptores**

Uno de los mecanismos fundamentales de transducción de las señales es llevado a cabo por proteínas que funcionan como enzimas-receptores. Estas proteínas tienen un dominio de unión al ligando en la superficie extracelular de la membrana plasmática y un enzimático con su sitio activo del lado citosólico, estando los dos dominios conectados por un simple segmento transmembranal. Generalmente, la enzima-receptor es una cinasa de proteína que fosforila residuos de tirosina en proteínas blanco específicas; el receptor de insulina es el prototipo de este grupo.

Otras enzimas-receptores producen un segundo mensajero intracelular como el GMP (guanósina 3',5'-monofosfato cíclico) en respuesta a señales extracelulares. El receptor para el factor natriurético atrial es típico de este tipo, la enzima de este receptor tiene actividad de guanilil ciclasa y produce el GMP a partir de GTP (guanósina 5'-trifosfato), este GMP producido actúa como segundo mensajero, activando a una cinasa de proteínas dependiente de GMP (PKG). Esta enzima altera el metabolismo por la fosforilación específica de enzimas blanco.

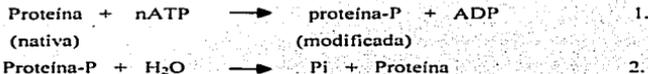
Un tercer mecanismo de transducción de señales, es definido por tres componentes esenciales: un receptor de la membrana plasmática con siete segmentos transmembranales, una enzima en la membrana plasmática que genera un segundo mensajero intracelular (adenilato ciclasa), y una proteína (proteína G) ligada a GTP que

se disocia cuando el receptor está ocupado y se une a la enzima, activándola. El receptor  $\beta$ -adrenérgico, que está regulado por la epinefrina en varios tejidos, es el prototipo de este sistema.

### Cinasas

Las cinasas de proteínas catalizan la transferencia de grupos fosfato hacia residuos específicos de aminoácidos, que pueden ser serina (Ser), treonina (Thr) o tirosina (Tyr), mientras que la eliminación del grupo fosfato es catalizado por fosfatasa de proteínas (Nelson y Cox, 2000).

La fosforilación es una de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas más estudiada. Básicamente, el sistema implica un mínimo de tres proteínas y dos reacciones:



La reacción 1 es catalizada por cinasa (s) de proteínas, y la reacción 2 (la opuesta) por fosfatasa (s) de fosfoproteína.

La fosforilación y defosforilación de las proteínas por cinasas y fosfatasas pueden ser responsables de la regulación de las actividades enzimáticas y sirven como un sistema de cascada para la amplificación de señales (Ranjeva y Boudet, 1987).

Los grupos fosfato o fosforilo que son unidos covalentemente a las proteínas por acción de las cinasas afectan la estructura y actividad catalítica de las proteínas, disminuyendo o aumentando su actividad a través de diferentes mecanismos como modificando la afinidad de una enzima por su sustrato.

Los residuos de serina, treonina o tirosina que son fosforilados en proteínas reguladas ocurren dentro de motivos estructurales comunes, llamadas secuencias consenso, que son reconocidas por cinasas para proteínas específicas (Tabla II). La regulación por fosforilación es bastante complicada. Algunas proteínas tienen secuencias consenso que son reconocidas por diferentes cinasas de proteína, las cuales pueden fosforilar la proteína y alterar su actividad enzimática. En algunos casos, la fosforilación es jerárquica: un cierto residuo puede ser fosforilado solo si un residuo ha sido fosforilado

previamente. Para servir como un mecanismo regulatorio efectivo, la fosforilación debe ser reversible (Nelson y Cox, 2000).

Tabla II. Secuencias consenso para cinasas de proteína

Cinasa de proteína	Secuencia consenso y residuo fosforilado*
Cinasa de la proteína A	-X-R-(R/K)-X-(S/T)-B-
Cinasa de la proteína G	-X-R-(R/K)-X-(S/T)-X-
Cinasa de la proteína C	-(R/K)-(R/K)-X-(S/T)-B-(R/K)-(R/K)-
Cinasa de la proteína B	-X-R-X-(S/T)-X-K-
Cinasa I de calmodulina/Ca <sup>2+</sup>	-B-X-R-X-X-(S/T)-X-X-X-B-
Cinasa II de calmodulina/Ca <sup>2+</sup>	-B-X-(R/K)-X-X-(S/T)-X-X-
Cinasa de la cadena ligera de miosina (músculo liso)	-K-K-R-X-X-S-X-B-B-
Cinasa de la fosforilasa b	-K-R-K-Q-I-S-I'-R-
Cinasa regulada – señal extracelular (ERK)	-P-X-(S/T)-P-P-
Cinasa de la proteína dependiente de ciclina (cdc2)	-X-(S/T)-P-X-(K/R)-
Cinasa I de caseína	-(Sp/Tp)-X-X-(X)-(S/T)-B
Cinasa II de caseína	-X-(S/T)-X-X-(E/D/Sp/Yp)-X-
Cinasa receptor β-adrenérgico	-(D/E) <sub>n</sub> -(S/T)-X-X-X-
Cinasa de rodopsina	-X-X-(S/T)-(E) <sub>n</sub>
Cinasa del receptor de insulina	-X-E-E-E-Y-M-M-M-M-K-K-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K-K-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-I'-G-D-
Cinasa del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF)	-E-E-E-E-Y-F-E-L-I'-

\* Los residuos de Ser (S), Thr (T), o Tyr (Y) que están bajo fosforilación están en negritas; todos los residuos de aminoácidos se muestran como sus abreviaciones de una letra. X representa cualquier aminoácido; B, cualquier aminoácido hidrofóbico; Sp, Tp, y Yp, son residuos de Ser, Thr, y Tyr ya fosforilados (Nelson y Cox, 2000).

Con respecto a algunas cinasas de proteínas en plantas que participan en la respuesta a patógenos se ha encontrado que en el arroz *Xa-21* y trigo *Lr10* que contienen la clase de genes R (gene de la resistencia), codifican a cinasas que funcionan como receptores con un dominio extracelular, un dominio en la membrana y un dominio de cinasa serina/treonina en el citosol. Se ha especulado que siguiendo la percepción de la señal del patógeno (tal como un evocador), el dominio de cinasa de estas proteínas podría disparar una cascada de fosforilación. Desafortunadamente, las proteínas que interactúan después de estos receptores no han sido identificadas. El gene *Pto* del tomate es la única clase de gene R que codifica una proteína citosólica con actividad de cinasa serina/treonina. Algunas de las proteínas que interactúan con la cinasa Pto han

sido identificadas. El gene *Pti1* (\*Pto-interactuando 1\*) codifica una cinasa serina/treonina que es probablemente el sustrato hacia abajo de Pto; otras tres proteínas, codificadas por los genes *Pti4*, *Pti5* y *Pti6*, se han encontrado que interaccionan con la cinasa Pto. Cada una de las tres proteínas pueden ser factores transcripcionales que actúan sobre la región promotora de un largo número de genes relacionados a la patogénesis (PR). En perejil, el reconocimiento de evocadores no específicos por la célula hospedera puede disparar una vía de señalamiento mediada por una cinasa de proteínas activada por mitógeno (MAPK). Los evocadores mitóticos inducen cambios en los estados de fosforilación de las proteínas de las células de tomate y estos cambios se correlacionan con el incremento en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  libre citosólico (Blumwald *et al.*, 1998).

#### **Cinasas de la membrana plasmática**

Se ha considerado que las cinasas asociadas a la membrana plasmática juegan un papel clave en varias vías de transducción de señales. En células animales, algunas de estas cinasas son receptores para moléculas de señales extracelulares fosforilando un residuo de serina, treonina o tirosina. Los genes putativos para las cinasas-receptores han sido encontrados en plantas recientemente y la fosforilación estimulada por luz azul de un polipéptido membranar con una Mr de cerca de 120 kDa, ha sido observada en varias especies. Otras cinasas asociadas a la membrana plasmática son estimuladas por mensajeros intracelulares, tales como iones de calcio (Baizabal y González de la Vara, 1994). En células animales, las cinasas de la proteína C son reguladas por segundos mensajeros, tales como diacilglicerol, esfingosina, lisofingolípidos y ácidos grasos insaturados (Oishi *et al.*, 1990). Con la excepción de la  $H^+$ -ATPasa, las proteínas en la membrana plasmática que son fosforiladas por cinasas no han sido identificadas.

Se ha caracterizado la actividad de cinasa de proteínas en la membrana plasmática de raíz de remolacha (*Beta vulgaris* L.), encontrándose dos cinasas de proteína en preparaciones enriquecidas de membrana plasmática. Las cinasas en estas preparaciones producen la fosforilación de diversos polipéptidos membranales de 77, 71 y 65 kDa. Con respecto a estas cinasas se encontró que una era dependiente de calcio de 64 kDa y la otra independiente de este catión (Baizabal y González de la Vara, 1994). Asimismo, una cinasa de proteínas regulada por calcio (CRPK) asociada con la membrana

plasmática de raíz de remolacha fue purificada y caracterizada, cuya masa molecular estimada fue de 58 kDa. La CRPK no reaccionó a anticuerpos contra cinasas de proteína dependientes de calcio (CDPK) de *Arabidopsis* o frijol, lo que sugiere que la CRPK y la CDPKs pueden ser diferentes enzimas, aunque muestran propiedades similares: (1) Ambas enzimas son estimuladas a concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$ . (2) Ambas tienen masas moleculares similares: 52-55 kDa para CDPK de frijol y 58 kDa para CRPK. (3) Ambas son cinasas Ser/Thr. (4) Las dos enzimas exhiben su curva de pH con forma de campana con un pH óptimo amplio. CRPK exhibe una actividad máxima entre pH 7.0 y 8.2, mientras que la CDPK del frijol tiene una actividad máxima entre pH 7.0 y 9.0. Entre las diferencias más importantes están que Mg-ATP es más eficiente para CRPK y Mg-GTP para CDPK. La cinética de CRPK indica que cuatro iones de  $\text{Ca}^{2+}$  unidos a la enzima fosforilan un péptido sustrato, mientras que para CDPK sólo se necesitan dos iones y finalmente la actividad de CRPK no es estimulada por fosfolípidos, a diferencia de la CDPK que sí lo es (Baizabal y González de la Vara, 1997).

El reconocimiento de los evocadores micóticos por receptores en la membrana plasmática del hospedero es considerado como uno de los eventos que encabeza la activación de mecanismos de defensa inducibles (Xing *et al.*, 1996). Recientemente se ha purificado y caracterizado en la membrana plasmática de raíz de remolacha un probable receptor de luz con actividad de cinasa, siendo este una glicoproteína de 120 kDa. Esta proteína muestra algunas características de otros receptores con actividad de cinasa: tiene un elevado peso molecular, se localiza en la membrana plasmática, cuando ha sido extraído mantiene su actividad y puede autofosforilarse. Se encontró que esta proteína de 120 kDa se fosforila fuertemente a pH alcalino y en presencia de luz, además fosforila principalmente residuos de treonina. Con estas observaciones se ha sugerido que este receptor puede ser similar a la fototropina, que es un receptor de luz azul implicado en el fototropismo (Raya y González de la Vara, 2001).

Por un estudio previo con cultivos de suspensiones de células de tomate ha sugerido que el reconocimiento de evocadores de *Cladosporium fulvum*, un patógeno micótico, por receptores putativos de la membrana plasmática del hospedero, resulta en la inducción de vías de transducción de señales que inician la respuesta de defensa contra el patógeno. Una de estas señales implica una rápida defosforilación de la  $\text{H}^+$  - ATPasa de

la membrana plasmática mediada por una fosfatasa, lo que lleva a un incremento significativo en la actividad de la enzima y a la subsecuente acidificación del medio extracelular (Vera-Estrella *et al.*, 1994I, 1994II). A este respecto se ha investigado la fosforilación reversible de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática de suspensiones de células de tomate después del tratamiento con evocadores micóticos específicos de raza, encontrando la implicación de dos cinasas de proteína que regulan la fosforilación de la  $H^+$ -ATPasa. El análisis de la fosforilación *in vivo* indicó que después de 30 min del tratamiento de las células fue obvia la defosforilación de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática. Cuando el tratamiento se extendió 1 o 2 h, el proceso de defosforilación se invirtió y se observó la refosforilación. En los experimentos *in vitro* con membranas aisladas no se observó la refosforilación, lo que sugiere que la refosforilación de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática del tomate requiere de elementos celulares que se pierden durante el proceso de aislamiento. Se determinó que en la fase 1 participa una cinasa C de proteínas (PKC), gracias al estudio realizado con activadores (SC-9, SC-10 y 13-acetato-12-miristato forbol o PMA) e inhibidores específicos de PKC: bisindolilmaleimida (20 nM), calfostina C (100 nM), queleritrina (1  $\mu$ M), y *N*-(2-guanidinaetil)-5-isoquinolinosulfonamida (HA1004 a 50  $\mu$ M), así como un inhibidor general de cinasas de proteínas (estaurosporina a 1  $\mu$ M). Estas concentraciones de inhibidores son menores o cercanas a las concentraciones que inhiben el 50% de la actividad de PKC en sistemas animales.

Finalmente, se encontró en la fase 2 una cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y calmodulina (CaM), al utilizar un antagonista de calmodulina W7, un inhibidor específico de cinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ /CaM (CaMKII) KN-62 y un agente quelante EGTA. Además el efecto de la cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ /CaM en la refosforilación de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática es condicional y depende de la activación previa de la cinasa PKC (Xing *et al.*, 1996).

Por otro lado, en raíz de maíz (*Zea mays* L.) se ha encontrado que la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática está regulada por una fosforilación dependiente de calcio, en la cual está participando una cinasa dependiente de calcio, lo cual fue demostrado al observar el efecto de  $Ca^{2+}$ , CaM, antagonistas de CaM como W5 (N-[6-aminohexil]-1-naftaleno sulfonamida) y W7 (N-[6-aminohexil]-5-cloro-1-naftaleno sulfonamida) y estaurosporina sobre la actividad de la  $H^+$ -ATPasa. No encontrándose

ningún efecto con los antagonistas de CaM pero sí con Ca<sup>2+</sup> y estaurosporina. La cinasa que está mediando la activación de la H<sup>+</sup>-ATPasa no ha sido identificada. Bajo las condiciones en que la proteína fue fosforilada, ambas actividades hidrolítica y de bombeo de protones fueron disminuidas de la misma manera, lo que indica que la fosforilación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de la raíz de maíz inhibe su actividad (De Nisi *et al.*, 1999).

## Segundos mensajeros

### a) AMPc

La célula responde a su medio ambiente por el ingreso de señales de hormonas u otras señales químicas externas (ver Tabla III). La interacción de estas señales químicas extracelulares (primeros mensajeros) con receptores en la superficie celular suele dirigir la producción de segundos mensajeros dentro de la célula, que en seguida conducen a cambios adaptativos en el interior celular. Con frecuencia, el segundo mensajero es un nucleótido. Uno de los más comunes es la adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico o AMPc) formado a partir del ATP en una reacción catalizada por la adenilato ciclasa, una enzima asociada con la cara interior de la membrana plasmática.

Tabla III. Algunas señales que utilizan el AMPc como segundo mensajero

Corticotropina (ACTH)
Hormona liberadora de corticotropina (CRH)
Dopamina [D-1, D-2]*
Epinefrina (β-adrenérgico)
Hormona estimulante del foliculo (FSH)
Glucagón
Histamina [H-2]*
Hormona luteinizante (LH)
Hormona estimuladora del melanocito (MSH)
Olorantes (diversos)
Hormona paratiroidea
Prostaglandinas E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub> (PGE <sub>1</sub> , PGE <sub>2</sub> )
Serotonina [5-HT-1α, 5-HT-2]*
Somatostatina
Degustantes (dulce, amargo)
Hormona estimulante de la tiroides (TSH)

\* Algunas señales tienen dos o más subtipos de receptores (mostrados entre corchetes), que pueden tener diferentes mecanismos de transducción.

El AMPc estimula a las cinasas de proteínas dependientes de AMPc (PKA). PKA regula el efecto de la epinefrina por fosforilación de proteínas clave en vías metabolizadoras de grasas y carbohidratos. Esta cascada de eventos, en la cual una hormona activa la catálisis de una molécula sencilla que enseguida activa la catálisis de otra y así sucesivamente, resulta en una larga amplificación de la señal, que es característica de todos los sistemas activados por hormonas.

b)  $\text{Ca}^{2+}$

En muchas células que responden a señales extracelulares, el  $\text{Ca}^{2+}$  funciona como un segundo mensajero que dispara las respuestas intracelulares, tales como la exocitosis en neuronas y células endocrinas y la contracción en músculos. Normalmente, la concentración citosólica del calcio se mantiene muy baja ( $<10^{-7}$  M) por la acción de las bombas de calcio en retículo endoplásmico, mitocondria y membrana plasmática. Cualquier estímulo hormonal ocasiona la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula a través de canales específicos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática o liberando el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el retículo endoplásmico o mitocondrias, en cualquier caso incrementando el  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico y disparando una respuesta celular.

La concentración citosólica de calcio suele oscilar con un período de pocos segundos, siempre y cuando la concentración extracelular de la hormona permanezca constante. El mecanismo bajo el cual se da esta oscilación presumiblemente implica una reacción de regulación por el  $\text{Ca}^{2+}$  de cualquiera fosfolipasa que genera  $\text{IP}_3$  (inositol 1,4,5-trifosfato) o el canal de ión que regula el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado del retículo endoplásmico, o ambos. Cualquiera que sea el mecanismo, el efecto es que una clase de señal (por ejemplo, una concentración hormonal) es convertida en otra (frecuencia y amplitud de las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ ).

c) Lípidos

Los lípidos biológicos son un grupo químicamente diverso de componentes. La característica común y que los define es su insolubilidad en el agua. Las funciones biológicas de los lípidos también son diversas como su química. Las grasas y los aceites son las principales formas de almacenaje de la energía en muchos organismos. Los fosfolípidos y los esteroides son los principales elementos estructurales de las membranas biológicas. Otros lípidos que se presentan en cantidades relativamente pequeñas, juegan papeles cruciales como cofactores enzimáticos, acarreadores de electrones, pigmentos

que absorben luz, soportes hidrofóbicos, agentes emulsificantes, como hormonas y mensajeros intracelulares (Nelson y Cox, 2000).

Los esfingolípidos son componentes estructurales de las membranas celulares que pueden ser metabolizados para generar catabolitos tales como ceramida, esfingosina y esfingosina-1-fosfato. Estos metabolitos son moduladores de moléculas transductoras implicadas en la transducción de señales y juegan papeles esenciales en la regulación de mitogénesis, diferenciación, muerte celular, detención del ciclo celular y en la senescencia (Megidish *et al.*, 1999). Esto se manifestó con el descubrimiento del ciclo del fosfoinositol. El cual reconoce que el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato es hidrolizado por la fosfolipasa C (PLC) que libera la cabeza hidrofílica que es el grupo inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) del esqueleto lipídico, el 1,2-diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> interactúa con un receptor membranal intracelular y dirige la movilización de Ca<sup>2+</sup>, mientras que el DAG se une directamente y activa cinasas de proteína C (PKC) y esto inicia una cascada de transducción de señales.

Se ha considerado al ácido araquidónico y a los fosfolípidos como segundos mensajeros y moduladores intracelulares (Huwiler *et al.*, 2000) tales como inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) (Nelson y Cox, 2000) diacilglicerol, esfingosina, lisoesfingolípidos y ácidos grasos insaturados (Oishi *et al.*, 1990).

Estructuralmente, los esfingolípidos se han definido por la presencia de un esqueleto esfingoideo (Huwiler *et al.*, 2000). En animales, la base esfingoidea más predominante es la esfingosina (Ng *et al.*, 2001) ([2S,3R,4E]-2-amino-1,3-dihidroxi-4-octadeceno) (Huwiler *et al.*, 2000). En contraste, las bases esfingoideas para plantas son predominantemente esfinganina, 4-hidroxi esfinganina y los isómeros cis y trans de 8-estingenina, 4,8-estingadieno y 4-hidroxi-8-estingenina (Ng *et al.*, 2001).

La esfingosina *N,N*-dimetil-esfingosina (DMS) es la forma metilada de la esfingosina. Muchos estudios han demostrado que la esfingosina y el DMS modulan la actividad de diversas cinasas de proteína, por citar algunas, cinasas dependientes de calmodulina, la cinasa de tirosina del receptor de insulina, cinasa II de caseína (CKII), cinasa del receptor de crecimiento epidermal y cinasa Src.

A la esfingosina, ceramida y esfingosina-1-fosfato se les ha considerado como segundos mensajeros en respuesta a estímulos exógenos (Megidish *et al.*, 1999).

El siguiente bloque de edificación en la estructura de los esfingolípidos es la ceramida, que es una esfingosina acetilada en la posición 2-amino. Muchos de los componentes de la maquinaria de señalamiento de la membrana plasmática residen en microdominios de la membrana enriquecidos en esfingolípidos y colesterol.

La biosíntesis de los esfingolípidos se lleva a cabo en el retículo endoplásmico (ER) y en el aparato de Golgi. A la fecha, se conoce que no hay enfermedades en humanos por defectos en la biosíntesis de esfingolípidos, pero sí por defectos en la degradación de los mismos. La degradación de los esfingolípidos sucede en los compartimentos ácidos de la célula, por citar algunos, en endosomas o en los lisosomas. Además de la vía de degradación lisosomal, la degradación puede ocurrir en membranas extralisosomales en respuesta a un estímulo intra o extracelular; presumiblemente en membrana plasmática y/o membranas endosomales. De tal modo que la formación de mensajeros lipídicos en demanda se da de manera regulada permitiéndole a la célula utilizar esta vía como su principal transmisión de señales de estrés.

#### Ceramida sintetasa.

La ceramida sintetasa (esfingosina *N*-aciltransferasa) cataliza la acilación de bases esfingoideas de larga cadena con un ácido graso tioéster de la coenzima A. La enzima es capaz de acetilar tanto esfingosina como esfinganina. Ambas bases esfingoideas producen la misma actividad máxima, sin embargo cuando se compara su  $V_{max}/K_m$  para ambos sustratos (248 para esfinganina, 90 para esfingosina) esfinganina es mejor sustrato que esfingosina. Estudios hacia develar la localización celular de la ceramida sintetasa indican una orientación citosólica de la enzima en la membrana del retículo endoplásmico. Algunas sustancias que se producen naturalmente han sido identificadas como inhibidores potentes de la ceramida sintetasa. La fumonisina B<sub>1</sub> y la fumonisina B<sub>2</sub>, dos micotoxinas producidas por *Fusarium moniliforme*, uno de los hongos más comunes del maíz y otros granos, muestran similitudes estructurales remarcables con la esfingosina, lo que sugiere una interferencia con el metabolismo de la esfingosina. Se determinó una IC<sub>50</sub> de 50-100 nM para la ceramida sintetasa por la fumonisina B<sub>1</sub>. La inhibición de la ceramida sintetasa es competitiva *versus* la base esfingoidea y mezcla con el ácido graso-CoA, lo cual indica que la fumonisina inhibe la ceramida sintetasa por interacción con los sitios de unión para ambos sustratos. Las toxinas de *Alternaria*, que son productos de *Alternaria alternata*, y australi-micotoxinas, productos de *Sporomilla*

*australis* son otros dos inhibidores de la ceramida sintetasa, aunque son menos potentes que las fumonisinas. *In vivo*, la ceramida sintetasa puede ser activada por varios agentes estimulantes, como son TNF $\alpha$ , choque de calor, hipoxia, hexadecilfosfolina y fenretinina. Entre las funciones biológicas de la ceramida, se encuentra la activación de cascadas de cinasas de proteínas activadas por mitógeno (MAPK), por citar algunas, las clásicas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) 1 y 2, y más recientemente descubiertas las cinasas de proteínas activadas por estrés SAPK. Estas vías de señalamiento paralelas regulan aspectos fundamentales de la función celular como el metabolismo, secreción y la expresión de genes.

#### Cinasas de ceramida

La cinasa de ceramida fosforila específicamente a la ceramida para generar ceramida-1-fosfato. Estudios de su localización subcelular indican su predominancia en la membrana plasmática. *In vivo*, se ha observado que la cinasa de ceramida es activada durante la fagocitosis de anticuerpos revestidos de eritrocitos por leucocitos polimorfonucleares. Además, la ceramida-1-fosfato estimula la fusión liposomal, indicando que la ceramida-1-fosfato puede promover la formación fagolisosomal, un evento crítico en la fagocitosis. Por otra parte, la aplicación extracelular de ceramida-1-fosfato puede estimular la síntesis de ADN y la división celular en fibroblastos. Sin embargo, el mecanismo por el cual la ceramida-1-fosfato exógena es tomada por las células y dispara la proliferación celular no es conocido.

#### Cinasa de esfingosina

La cinasa de esfingosina es una enzima que cataliza la fosforilación de esfingosina para formar esfingosina-1-fosfato. En algunos tipos de células, la esfingosina exógena es capaz de estimular la proliferación celular. Este efecto mitogénico de la esfingosina puede ser mediado por su conversión en esfingosina-1-fosfato. Se ha encontrado que la cinasa de esfingosina es una enzima citosólica expresada ubicuamente. Su actividad se incrementa en respuesta a ciertos agentes promotores del crecimiento tales como el éster de forbol y la subunidad B de la toxina del cólera.

En estudios recientes, se purificó esta cinasa del riñón de rata. La enzima purificada mostró una masa molecular aparente de 49 kDa bajo condiciones desnaturalizantes, un pH óptimo de 6.6-7.5 y una especificidad de sustrato por D-crito-esfingosina. Además, no fosforiló al fosfatidilinositol, diacilglicerol o a la ceramida. *N,N*-dimetilesfingosina y

DL-treo-dihidroesfingosina fueron encontrados como inhibidores competitivos de la cinasa de esfingosina purificada, con valores de  $K_i$  de 9.9 y 5.2  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Huwiler *et al.*, 2000).

Se ha encontrado un grupo de cinasas de proteína activadas específicamente por esfingosina y DMS pero no por otros esfingolipidos, denominadas cinasas de proteína dependientes de esfingosina (SDKs). Una proteína chaperona 14-3-3 fue identificada como un sustrato de estas cinasas. Así como también recientemente hicieron la caracterización de un miembro de las SDKs, denominado SDK1, que es una cinasa de serina que fosforila específicamente solo ciertas isoformas de la proteína 14-3-3 ( $\beta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) e identificaron el sitio de fosforilación en la proteína 14-3-3. En este estudio se hizo el aislamiento, purificación y la identificación de varias proteínas celulares que son fosforiladas *in vitro* por SDKs para extractos de fibroblastos Balb/c 3T3 (A31), entre los cuales se encuentran PDI, calreticulina, HSP84, HSP86, GRP94 mismos que fueron identificados de acuerdo a los siguientes criterios: (i) fosforilación por cinasas endógenas sólo en presencia de esfingosina o DMS; (ii) la secuencia parcial del amino ácido de la proteína aislada; (iii) confirmación con sustratos purificados aislados para otras fuentes que fueron fosforilados con SDK semipurificadas de manera dependiente de DMS o esfingosina. PDI y calreticulina fueron identificados por los tres criterios y HSP84, HSP86 y HSP94 sólo con los criterios i y ii (Megidish *et al.*, 1999).

En células animales ha sido reportado que la esfingosina-1-fosfato puede estar implicada en la mediación de numerosos eventos celulares incluyendo la proliferación y sobrevivencia celulares, en la organización del citoesqueleto, en la motilidad y en la diferenciación. Finalmente con respecto a la esfingosina-1-fosfato (S1P) en plantas se ha encontrado recientemente que en un estudio con hojas de *Commelina communis* sometidas a un tratamiento de sequedad, los niveles de esfingosina-1-fosfato se incrementaron, encontrando evidencia de que esta molécula está implicada en la vía de transducción de señales que se relaciona con la percepción de ácido abscísico en la reducción de la turgencia de las células guarda (Ng *et al.*, 2001). Este es el único reporte en plantas de una base esfingoidea como mediador celular. Como un primer paso se confirmó la presencia de S1P en extractos de la planta y después se demostró la posible habilidad de S1P de modular la turgencia de las células guarda por mediciones en los cambios de las aperturas estomatales después de la incubación de tiras epidermales de

*C. communis* en un amortiguador que contiene S1P, encontrándose que S1P promueve el cierre del estoma abierto, siendo este efecto reversible. En células animales, el efecto de S1P en la función celular es dependiente de calcio. Los resultados finales de este estudio muestran que S1P induce el cierre del poro estomatal generando un incremento en calcio. La regulación de la turgencia del estoma por el ácido abscísico (ABA), genera un incremento en los niveles citosólicos de calcio (Ng *et al.*, 2001), mediando cambios en el tamaño de poro del estoma e involucrando una activación e inhibición coordinada de canales de iones presentes en membranas plasmáticas y vacuolares (Fan *et al.*, 2002). Queda por demostrar el mecanismo mediante el cual la esfingosina-1-fosfato actúa en la vía de señalamiento de ABA en las células guarda (Ng *et al.*, 2001).

Recientemente se realizó un estudio donde se examinó el papel de S1P en la regulación de las actividades de canales de iones en protoplastos de células guarda de *Arabidopsis*. Encontrando que al utilizar *N,N*-dimetilefingosina, un inhibidor de cinasa de esfingosina en células animales, ABA significativamente atenúa la inhibición y promueve el cierre estomatal. Estos efectos se reflejaron en cambios coordinados en las actividades tanto de canales de  $K^+$  interiores y en los de canales lentos de aniones. Sugiriendo así que S1P es componente de la vía de transducción de la señal – ABA que regula la turgencia de células guarda en *Arabidopsis* (Fan *et al.*, 2002).

## **G) SISTEMAS DE TRANSDUCCION INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA.**

Una vez que sucede el reconocimiento del patógeno por parte del hospedero, las primeras reacciones detectables en las células de la planta son la apertura de conductos específicos de iones y la formación de especies reactivas de oxígeno, tales como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH\cdot$ , probablemente por la vía de acción de NADPH oxidasas asociadas a la membrana plasmática y/o peroxidasas localizadas en el apoplasto. Estas reacciones iniciales son, al menos en parte, prerequisites para más eventos de transducción de señales, que posiblemente resulten en la elaboración de una compleja red de señalamientos que disparan la respuesta de defensa en el caso en el que se observa resistencia a la enfermedad. Esta red consta de numerosos cambios en la actividad metabólica, incluyendo cambios en la polaridad de la membrana, las concentraciones citosólicas de  $H^+$  y  $Ca^{2+}$ , y la actividad de diversas enzimas reguladas alostéricamente.

tales como NADPH oxidasas, fosfolipasas, fosfatasa y cinasas. Estos cambios particulares probablemente tienen efectos en varias vías metabólicas y en la activación de genes de proteínas importantes en la defensa. Por ejemplo, se ha encontrado que la inducción específica de fosfolipasas actúa sobre ácidos grasos insaturados como parte de lípidos de membrana, resultando en la liberación de ácido linoléico, que sirve como sustrato para la producción de ácido jasmónico y metil jasmonato. Se ha encontrado que estos componentes y sus precursores actúan como moléculas señales bajo ciertas condiciones, incluyendo el ataque por patógenos (Somssich y Hahlbrock, 1998). A continuación se mencionan varias entidades moleculares involucradas en los mecanismos de respuesta a patógenos.

### **Proteínas G.**

Las proteínas G actúan como moléculas transductoras de señales cuyo estado activo o inactivo depende de su unión a GTP o GDP, respectivamente.

Las proteínas G incluyen dos importantes subfamilias, las proteínas G heterotriméricas y las proteínas G pequeñas. Mientras la proteína G heterotrimérica contiene las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , la proteína G pequeña parece ser similar a la subunidad  $\alpha$  libre, operando sin el heterodímero  $\beta\gamma$ . Generalmente, la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica es la región de unión a un receptor específico que une a una molécula derivada del patógeno o de la acción del patógeno y domina el sitio de unión del nucleótido guanosina y la actividad de la GTPasa. Ambas clases de proteínas G utilizan el ciclo GTP/GDP como un interruptor molecular para la transducción de señales. La interacción de la proteína G con el receptor activado promueve el intercambio de GDP, unido a la subunidad  $\alpha$ , por GTP y la subsecuente disociación del complejo  $\alpha$ -GTP del heterodímero  $\beta\gamma$ .

### **Homeostasis del calcio.**

Muchos de los procesos celulares, incluyendo la respuesta de la planta ante el patógeno, son regulados por cambios en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , donde el  $\text{Ca}^{2+}$  libre puede servir para transducir un estímulo particular hacia proteínas blanco que dirigen la respuesta celular. Muchas de las respuestas bioquímicas asociadas con los mecanismos de defensa se correlacionan directamente con un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$

libre en el citosol. Mediciones del  $\text{Ca}^{2+}$  externo con electrodos selectivos de iones y del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando técnicas radiométricas han revelado una larga y trascendental afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  con una concomitante acidificación del medio extracelular. Esto sugiere una correlación entre la actividad del evocador micótico, la hiperpolarización de la membrana plasmática de la célula hospedera, y la afluencia del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. La activación de conductos de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática por evocadores específicos y no específicos proporcionan una directa demostración de una vía por la cual las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol incrementan sus niveles, que pueden iniciar varias respuestas de defensa, incluyendo la producción de especies reactivas de oxígeno, callosa y fitoalexinas.

La estimulación de la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , sin su control subsecuente es poco probable, ya que tendría dos desventajas para la célula hospedera:

- a) La incapacidad de sostener altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que son responsables de cambios bioquímicos interiores.
- b) La ineficiente utilización de la energía para el mantenimiento de la función de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa asociada a la membrana plasmática.

Recientemente se ha encontrado que inmediatamente después del tratamiento de células de jitomate con evocadores incompatibles de *Cladosporium fulvum*, la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza paralelamente a la inhibición de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa asociada a la membrana plasmática. Estos resultados sugieren que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico dependiente del evocador está coordinado en la célula y que éste actúa como señal para la activación de pasos posteriores en vías metabólicas.

#### **NADPH oxidasa.**

Entre las respuestas de defensa de la planta ante el ataque del patógeno, juega un papel importante la producción rápida de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y su probable precursor, el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ).

La liberación de estas especies reactivas de oxígeno durante el estrés oxidativo pueden afectar el ataque del patógeno y el sitio de infección de la célula hospedera, de este modo se limita la propagación del patógeno (Blumwald *et al.*, 1998).

El incremento en la actividad de la NADPH oxidasa puede inducir la generación de aniones superóxido, que después de ser dismutado espontáneamente o enzimáticamente

por medio de la superóxido dismutasa como se mencionó anteriormente en la reacción de especies reactivas de oxígeno, y junto con el incremento en la concentración de  $H^+$  en el compartimento de la pared celular, puede ser la principal fuente de formación de  $H_2O_2$  (Vera-Estrella *et al.*, 1994II).

Por otro lado existen grandes similitudes entre la NADPH oxidasa de células de planta y las células fagocíticas de animales. En las células fagocíticas, la cadena transportadora de electrones, localizada en la membrana plasmática, consta de un citocromo *b* que es un heterodímero (gp91-phox y p22-phox), el cual no es funcional hasta que por lo menos tres proteínas, p47-phox, p67-phox y Rac (una proteína G monomérica), se mueven del citosol para acoplarse al citocromo *b*. El proceso de acoplamiento implica la interacción de tres dominios Src homólogos (SH3) en p47-phox (activada vía una cinasa de proteína C, PKC, mediante fosforilación) con p22-phox. Después del proceso de acoplamiento, el componente transportador de electrones es capaz de transferir electrones del NADPH hacia el oxígeno. En plantas se ha encontrado que la inducción del estrés oxidativo por evocadores en frijol, perejil y en *Arabidopsis* es inhibido por iodonio difenileno, un inhibidor de la NADPH oxidasa de mamíferos. Anticuerpos obtenidos contra neutrófilos humanos p47-phox y p67-phox dan reacción cruzada con proteínas de la misma masa molecular en extractos de frijol, algodón, *Arabidopsis* y jitomate, y recientemente han sido clonados en plantas genes homólogos a los que codifican para NADPH oxidasa gp91-phox de neutrófilos. Como en fagocitos, el tratamiento de células de jitomate con evocadores de razas de patógenos específicos, ha mostrado por inmunocitoquímica que induce la translocación de p47-phox, p67-phox y proteínas como Rac, desde el citosol hacia la membrana plasmática.

Estos procesos de montaje suelen implicar la fosforilación de estas proteínas. La similitud entre el modo de acción de la NADPH oxidasa de jitomate y la de fagocitos sugiere que plantas y animales muestran elementos comunes en estas vías de transducción de señales. Sin embargo, hay evidencia bioquímica que apoya la implicación de diferentes cinasas de proteína en la activación de p47-phox y p67-phox en fagocitos y en células de la planta. Estas diferencias pueden reflejar los requerimientos exclusivos para la distribución temporal y espacial en las plantas y diferencias en el desarrollo y señales ambientales a los que la planta debe responder.

**H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática.**

La H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática es esencial para el crecimiento de las células. La extrusión de protones forma el gradiente electroquímico de protones de lado a lado de la membrana plasmática e impulsa los diferentes sistemas de transporte acoplados a H<sup>+</sup> (antiporte y simporte) y el mecanismo de transporte (uniporte) acoplado al potencial de membrana para entrada y salida de solutos. Además, el potencial de membrana regula muchos canales de iones integrados a la membrana plasmática. Por otra parte, la acidificación del medio extracelular regula las propiedades físicas y bioquímicas de la pared celular. Cambios en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática del hospedero están entre los eventos tempranos asociados con la elicitación. En algunos casos, el tratamiento con evocadores resulta en una inhibición de la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa y la concomitante despolarización del potencial membranaral. En otros casos, este tipo de tratamiento resulta en una activación de la H<sup>+</sup>-ATPasa, con la consecuente acidificación del medio extracelular y una hiperpolarización del potencial de membrana. Se ha propuesto que el efecto diferencial de los evocadores en la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática y el resultado de acidificación o alcalinización del medio extracelular puede dirigir la respuesta ante el patógeno (Blumwald *et al.*, 1998; Schaller y Oecking, 1999).

Por lo tanto, inmediatamente después de que suceden los procesos de reconocimiento del patógeno, las vías de transducción de señales activan enzimas asociadas a la membrana plasmática. Esta evidencia sugiere que estas vías pueden implicar la activación de proteínas G heterotrimericas y fosfatasa unidas a la membrana que subsiguientemente regulan la activación de H<sup>+</sup>-ATPasas y conductos de Ca<sup>2+</sup>. El incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el citosol inicia la activación de un número de cinasas de proteína que inducen una serie de respuestas de defensa (tales como el estrés oxidativo, síntesis de callosa y activación de H<sup>+</sup>-ATPasas) y son responsables para la resolución espacial y temporal de la respuesta de defensa (Blumwald *et al.*, 1998).

**HIPOTESIS**

Si la FB<sub>1</sub> constituye una señal del patógeno para la célula, es posible que ésta responda con mecanismos que involucren la activación de cinasas membranales y que pueden estar relacionados con bases esfingoideas.

**OBJETIVO GENERAL**

Identificar polipéptidos de membrana plasmática fosforilados diferencialmente por efecto de la fumonisina B<sub>1</sub> de acuerdo a su peso molecular y a su punto isoeléctrico.

**OBJETIVOS PARTICULARES**

- Establecer una técnica para separar proteínas membranales por pHi y por PM.
- Establecer las condiciones para detectar fosforilación de las proteínas membranales.
- Explorar si una base esfingoidea, cuya estructura es similar a la de la FB<sub>1</sub> y que además se acumula por inhibición de la ceramida sintetasa, produce efectos análogos a los de la FB<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas membranales.
- Identificar por secuencia del extremo amino terminal alguna(s) de las proteínas cuya fosforilación es más afectada por FB<sub>1</sub> o esfinganina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. Material biológico.

Durante el trabajo de tesis se utilizaron embriones de semillas de maíz Chalqueño, los cuales fueron embebidos 24 horas. El ensayo de imbibición se realizó de acuerdo al diagrama de la Figura 3.

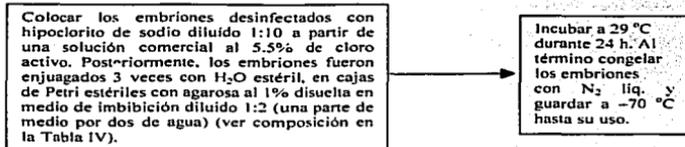


Figura 3. Procedimiento seguido para embeber a los embriones.

### II. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática.

Una vez que los embriones de maíz fueron embebidos se hizo la obtención de la fracción microsomal (basado en Packer y Douce, 1987), que se llevó a cabo de acuerdo al esquema de la Figura 4.

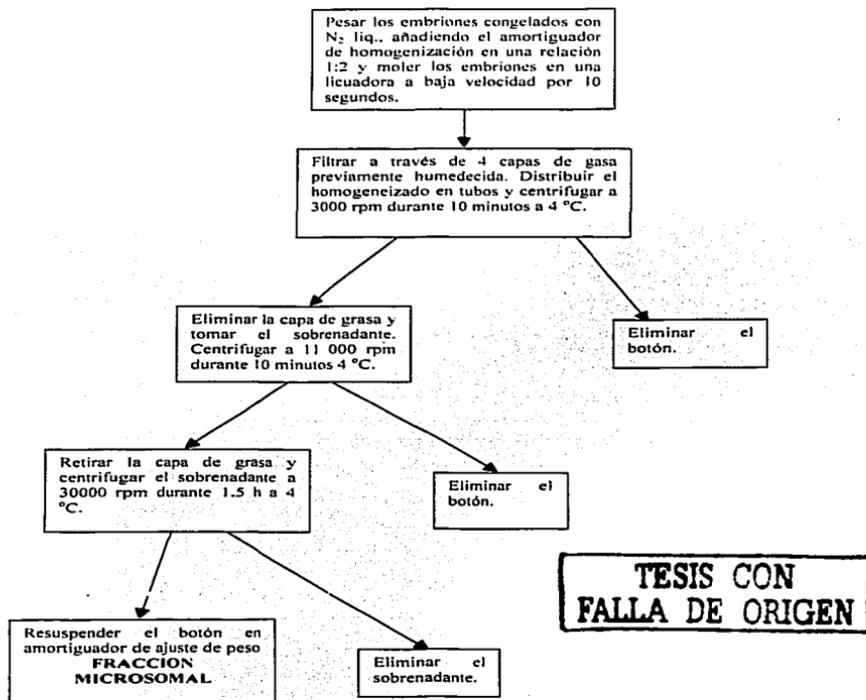


Figura 4. Procedimiento de obtención de la fracción microsomal.

La lista de reactivos empleados para la obtención de las vesículas de membrana plasmática se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV. Composición de medios utilizados en la obtención de fracciones subcelulares de los embriones.

Amortiguador	Composición
De imbibición	KCl 50 mM; Tris 50 mM a pH 7.6; MgCl <sub>2</sub> 10 mM y Sacarosa al 2 <sup>o</sup> .
De homogenización	Sorbitol 250 mM; HEPES/BTP 50 mM pH 7.8; DTE 5 mM; EDTA 1 mM; KCl 1 mM y Cocktail de inhibidores de proteasas 40 µg/mL.
De resuspensión del botón microsomal y de ajuste de peso	Sorbitol 500 mM; DTE 5 mM; KPi 5 mM pH 7.8 y KCl 0.2 mM.
De lavado de membranas plasmáticas	Sorbitol 350 mM; HEPES/MES 2 mM pH 7.6; DTE 1mM; KCl 1 mM y Cocktail de inhibidores de proteasas 40 µg/mL.

Para preparar los diferentes medios utilizados en la obtención de fracciones subcelulares se partió de las siguientes soluciones stock:

- Sorbitol 1633 mM
- HEPES 500 mM ajustar a pH de 7.8 con BTP.
- HEPES 500 mM ajustar a pH de 7.8 con MES.
- DTE 300 mM
- KPi 200 mM pH 7.8
- EDTA 100 mM
- KCl 50 mM

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Después de obtener la fracción microsomal se hizo la determinación de la concentración de proteína según el método descrito en el punto III, para continuar con la obtención de la preparación enriquecida en vesículas de membrana plasmática (VMP), y que se describe a continuación, para lo cual primero se preparó una mezcla de fases como se indica en la Tabla V y luego un sistema de fases.

Tabla V. Composición de las soluciones empleadas para preparar la mezcla de fases.

COMPONENTES	Mezcla de fases (MF) de 8.1 g
Dextrán T500 20%	3.618 g
Polietilenglicol (PEG) 40%	1.809 g
Sorbitol 1.633 M	0.688 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 200 mM	270 µL
KCl 50 mM	43.2 µL

Se adicionaron 25 mg de proteína microsomal a una mezcla de fases de 8.1 g de peso, preparada como se indicó en la Tabla V. Se añadió amortiguador de ajuste de peso para alcanzar un peso de 10.8 g (peso total que da la mezcla de fases y las membranas), se mezcló por inversión alrededor de 37 veces y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase superior (Fase U1) y se añadió a la fase de dextrán 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 centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se recuperó la fase superior (Fase U2). Este procedimiento se ilustra en el diagrama de la Figura 5.

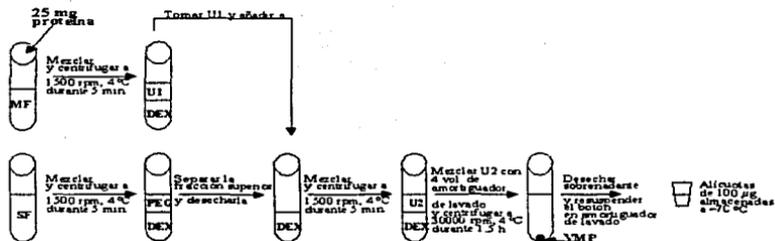


Figura 5. Diagrama que ilustra el procedimiento de purificación de las VMP.

Se colectó la fase U2 y se diluyó usando una relación de 4 volúmenes de amortiguador de lavado por una de U2. mezclar bien y se centrifugó a 30 000 rpm durante 1.5 h a 4 °C. El botón obtenido se resuspendió en un volumen pequeño de amortiguador de lavado y se le realizó la determinación de la concentración de proteína, finalmente se almacenó en alicuotas de 100 µL a -70 °C.

### III. Determinación de proteína.

Se determinó la cantidad de proteína presente usándose el método de Lowry *et al.* modificado por Peterson 1977.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**IV. Ensayo de fosforilación in vitro de proteínas en vesículas de la membrana plasmática.**

El ensayo de fosforilación constó de varias etapas:

- a) Reacción de fosforilación.- Consistió en hacer la incubación de las vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz en presencia y ausencia de FB<sub>1</sub>, Fitoesfingosina, Esfingalina o Ceramida. Primero se hizo una mezcla general cuya composición se indica en la Tabla VI y que sirve de base para hacer la mezcla de reacción (Tabla VII), la cual ya contiene la FB<sub>1</sub> o esfingalina más la mezcla general y en la que se hizo la incubación de las vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz, como se indica en la Tabla VII, durante 20 minutos a 29 °C en ausencia de luz.

Tabla VI.- Composición de la mezcla general utilizada en el ensayo de fosforilación.

[Final]	18.8 mM	1 mM	1 mM	2.5 mM	10 µM	0.015%	16µM	2 µCi/ 30 µg
Stock	300 mM pH 7.0	30 mM pH 7.0	30 mM pH 7.0	25 mM	32 mM	1%	160 µM	
Solución	HEPES/TRIS	EGTA/TRIS	HEDTA/TRIS	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	Brij 58	ATP <sub>free</sub>	AT <sup>32</sup> P
x600µg	20.0 µL	10.0 µL	10.0 µL	37.2 µL	15.4 µL	4.8 µL	32 µL	*

\* Se hizo el cálculo del decaimiento correspondiente a fin de tener las cpm de 40 µCi/600 µg.

Tabla VII.- Composición de la mezcla de reacción.

TUBO	MEZCLA GENERAL	FB <sub>1</sub> 10 µM; = [SN]; = [FSF] o = [Ceramida]	H <sub>2</sub> O	MEMBRANAS	Vol. Total
A	*	---	**	300 µg	160 µL
B	*	***	**	300 µg	160 µL

\* y \*\* Estos volúmenes dependieron de la cantidad de [<sup>32</sup>P] ATP según el cálculo del decaimiento y de la concentración de proteína de la preparación particular de que se trate.

\*\*\* Este volumen depende de la concentración de la solución stock de la cual se partió.

La lista de las soluciones stock empleadas en cada una de las mezclas de reacción (\*\*\*) de los ensayos de fosforilación, fue la siguiente:

- [Fumonisina B<sub>1</sub>]= 100 µM.
- [Esfinganina]= 3.3 mM. de la cual se realizaron las diluciones en serie para preparar las concentraciones de 1 mM, 50 µM, 500 nM y 50 nM (SIGMA, catálogo D-6783).
- [Fitoesfingosina]= 1 mM a partir de la cual se prepararon diluciones de 50 µM, 500 nM y 50 nM (SIGMA, catálogo P-2795).
- [Cerámida]= 3.3 mM preparándose las mismas diluciones que para los compuestos precedentes (SIGMA, catálogo C-2137).

Dependiendo del ensayo de fosforilación que se realice la reacción se puede detener adicionando amortiguador de equilibrio cuya composición se menciona en el inciso c del punto V en una relación de 1:1 durante 15 minutos o bien se continúa con el siguiente punto.

- b) Precipitación de proteínas.- La reacción de fosforilación se detuvo una vez que se llevó a cabo la incubación, añadiendo una mezcla de etanol:acetona (1:1) fría en una relación con respecto a la muestra 1:3 (1 parte de muestra por tres de etanol-acetona), la cual se mezcla y se incuba a -20 °C durante una hora. Además de detener la reacción de fosforilación, con este paso se logró hacer la precipitación de las proteínas membranales que es necesaria para poder llevar a cabo la separación de las proteínas por un enfoque isoeléctrico, ya que tiene que concentrarse la proteína y además eliminarse los componentes de la reacción de fosforilación.
- c) Determinación de la concentración de proteína.- Una vez terminado el tiempo de incubación en frío, las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad en una microcentrífuga Beckman durante 10 minutos a -4 °C. Posteriormente se desechó el sobrenadante en un contenedor de líquidos para desechos radioactivos y se hizo una cuidadosa resuspensión del botón de las muestras con pipeta gilson y jeringa de insulina de aguja corta en un volumen máximo de 15 µL de agua bidestilada. Con parte de cada muestra se preparó una dilución con agua bidestilada 1:10 para hacer

por triplicado la determinación de la concentración de proteínas presentes en las muestras fosforiladas antes de ser cargadas al gel de enfoque isoeléctrico. La determinación de proteína se realizó como se menciona en el punto III.

- d) Resuspensión de las muestras.- Después de realizar los cálculos correspondientes a la obtención de la concentración de la proteína se hicieron los cálculos necesarios para tomar entre 90 y 100  $\mu\text{g}$  de proteína fosforilada según el experimento, la cual se resuspendió en un amortiguador como se describe en la Tabla VIII y que es el indicado para poder realizar una separación por punto isoeléctrico (basado en Hurkman, 1986). Se deben hacer los ajustes necesarios con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada para utilizar la misma cantidad de amortiguador de solubilización.

Tabla VIII.- Composición y preparación del amortiguador de solubilización de proteínas para separarse por enfoque isoeléctrico (pH 3/10).

COMPONENTES (Concentración final)	PARA 2 mL	PARA 4 mL
9 M UREA	1.08 g	2.16 g
4% CHAPS	80 mg	160 mg
0.5% DTT	10 mg	20 mg
2.4% anfolinas 3/10	48 $\mu\text{L}$	96 $\mu\text{L}$

Se hicieron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  y se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$ .

**V. Separación de proteínas por enfoque isoeléctrico (EIE) (Primera dimensión).**

Una vez que se tuvieron las muestras  $\pm \text{FB}_1$  o  $\pm \text{SN}$  fosforiladas y resuspendidas en su amortiguador de solubilización, se procedió a cargar las muestras en los geles en capilar para su separación por punto isoeléctrico, los cuales fueron preparados previamente y de la siguiente manera:

a) Preparación de los geles en capilar.

1.- Preparación del gel para enfoque isoelectrico (EIE), de acuerdo a la composición que se muestra en la Tabla IX. La solución del gel se deaerea 15 min sin añadir el persulfato de amonio y el TEMED.

2.- Se colocan 12 capilares nuevos en un tubo capilar contenedor, cerrado por uno de sus extremos con parafilm y se colocaron sobre una superficie nivelada.

3.- Se añade a la solución de monómeros el TEMED y el persulfato de amonio 10%. Se mezcla y se toma la solución con una jeringa de 5 mL (sin la aguja) y se vacían los 4 mL (este es el volumen para 12 capilares) en el tubo contenedor, de tal modo que los capilares se llenan por capilaridad, dar unos golpecitos para eliminar las burbujas que puedan estar presentes.

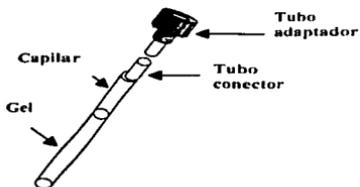
Tabla IX.- Composición del gel para EIE.  
COMPONENTES

9 M UREA
2.3% CHAPS
2.4% Anfólinas 3/10 o
2% Anfólinas 3/10 – 5% Anfólinas 5/7*
5.3% Acilamida-Bisacrilamida
0.01% Persulfato de amonio
TEMED

\*Dependiendo del intervalo con el cual se trabaje, ya sea de pH de 3/10 o pH de 4/7 será la mezcla de anfólinas.

4.- Dejar polimerizar aproximadamente 2 horas.

5.- Al término se sacan los capilares del tubo contenedor y se enjuagan con abundante agua bidestilada, se secan y se les coloca a cada uno su respectivo tubo conector y tapón adaptador (en el siguiente dibujo se muestran las partes mencionadas).



6.- Se colocó con ayuda de una jeringa Hamilton en la parte superior de cada capilar el amortiguador del cátodo, que es una solución de NaOH 100 mM previamente deaerada, cuidando de evitar la formación de burbujas, llenar hasta el tope del tapón adaptador.

7.- En una cámara que servirá como contenedor del soporte para los capilares, se coloca en la parte inferior el amortiguador del ánodo, que es una solución de  $H_3PO_4$  10 mM y se coloca un agitador magnético.

8.- Introducir el soporte de capilares en la cámara contenedora.

9.- Se coloca cada capilar en el lugar correspondiente en el soporte para capilares, asegurándose de que estén bien apretados los tapones adaptadores con el espacio asignado para cada capilar, el cual fue identificado previamente, esto se hace con la ayuda de un marcador indeleble, así como tener cuidado de evitar la formación de burbujas en el extremo inferior de cada capilar y de que el cable del ánodo quede bien cubierto con la solución amortiguadora.

10.- Llenar la parte superior del soporte para capilares con la solución del amortiguador del cátodo, cuidando que no naya burbujas en cada tapón adaptador, en el espacio entre éstos y que el cable del cátodo esté bien sumergido.

11.- Tapar la cámara con su tapa correspondiente y llevar el sistema al refrigerador de 4 °C donde se ha colocado previamente una parrilla de agitación, a fin de que en la parte inferior de la cámara se este agitando constantemente y se evite la formación de burbujas y se caliente. Se conecta a la fuente de poder la tapa y se corre a 400 V durante una hora (Precorrida).

12.- Una vez pasado este tiempo se saca la cámara y se quita el exceso de amortiguador del cátodo (guardándose para su uso posterior). El sistema está listo para el cargado de las muestras.

b) Cargado de las muestras.

1.- Se cargan las muestras de proteína tratada  $\pm$  FB<sub>1</sub> o  $\pm$  SN con aproximadamente 100  $\mu$ g de cada una, así como 5  $\mu$ L de estándar de proteínas marcadoras de punto isoeléctrico y peso molecular en su capilar correspondiente, este cargado se realiza con ayuda de una jeringa Hamilton.

El estándar utilizado fue el de Bio-Rad, catálogo 161-0320, el cual está compuesto por las siguientes proteínas:

PROTEINAS	pHi	PM (Daltones)
Conalbúmina	6.0-6.6	76.000
Albúmina	5.4-5.6	66.200
Actina	5.0-5.1	43.000
Gliceraldehído 3- Fosfato dehidrogenasa	8.3-8.5	36.000
Anhidrasa carbónica	5.9-6.0	31.000
Inhibidor de tripsina	4.5	21.500
Mioglobina equina	7.0	17.500

2.- A cada capilar se le aplican 15  $\mu$ L de la solución OVERLAY cuya composición se muestra a continuación:

Para el intervalo de pH de 3-10: 5 M UREA  
2.4% anfolinas 3/10

Para el intervalo de pH de 4-7: 5M UREA  
2% anfolinas 3/10  
5% anfolinas 5/7

3.- Se llena la parte superior del soporte para capilares con el amortiguador del cátodo que se retiró y guardó anteriormente, cuidando de no formar burbujas.

4.- Se tapa la cámara y se vuelve a colocar en el refrigerador de 4 °C y se conecta a la fuente, dejando correr las muestras a 400 V durante toda la noche (un total de aproximadamente 18 horas).

Adicionalmente se utilizaron tiras con un gel preformado las cuales son de Bio-Rad, catálogo 163-2001 y contienen anfollinas e inmobilinas que generan un gradiente inmóvil de pH a lo largo del gel que está adherido a una tira plástica, asegurándose con esto una buena separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoelectrónico. En este caso sólo se emplearon tiras del intervalo de pH de 4 a 7. Las tiras necesitan hidratarse previamente a su corrimiento, lo cual se realiza junto con el cargado de la muestra utilizando el siguiente amortiguador de solubilización:

### AMORTIGUADOR DE MUESTRA/HIDRATACION

9 M UREA  
4% CHAPS  
0.5% DTT  
0.4% 3/10 Anfollinas

Hidratación. Se utiliza una bandeja de hidratación la cual consta de 12 carriles, a cada carril le corresponde una tira. La muestra se prepara como se mencionó en el punto IV y se resuspende en este nuevo amortiguador utilizando siempre como volumen final 125 µL, este volumen se distribuye a lo largo del carril correspondiente, colocando encima la tira con la cara del gel en contacto con el amortiguador. Se cubre la tira con 2 mL de aceite mineral de Bio-Rad, catálogo 163-2129 y se deja durante toda la noche a 4 °C.

Condiciones de corrida. Se emplea la bandeja de corrimiento, la cual es como la de hidratación pero ésta contiene los electrodos, los cuales deben ser cubiertos con papel absorbente prehumedecido con 8 µL de H<sub>2</sub>Odd, en cada uno de los extremos del carril correspondiente, con esto la bandeja esta lista para cargar la tira hidratada, para ello se debe quitar el exceso de aceite y se saca la tira de la bandeja de hidratación con ayuda de unas pinzas y se coloca en la bandeja de corrida con la cara del gel hacia los electrodos de esta, se cubre con 2 mL de aceite mineral y se lleva al equipo de Bio-Rad PROTEAN IEF Cell y

se ajustan las condiciones de corrida. Las cuales son aproximadamente de 7 horas, con un voltaje que va de 800V hasta los 10 000V. Una vez terminado el tiempo de corrida las tiras se guardan a  $-70^{\circ}\text{C}$  o bien se les realiza el mismo tratamiento que a los capilares, a partir del punto 3 del siguiente inciso.

c) Equilibrio de los geles en capilar.

- 1.- Al día siguiente se apaga la fuente de poder y se retira la cámara del refrigerador.
- 2.- Se saca el gel del capilar con ayuda de un aparato que se adapta a una jeringa con agua bidestilada, el capilar con el gel se adapta a este aparato y el gel es expulsado por presión. este procedimiento se debe hacer muy lentamente. El gel se recibe en un recipiente que puede ser elaborado con papel parafilm (en forma de barquito). Se debe tener mucho cuidado con la orientación del gel, es decir, identificar el cátodo y el ánodo. Este paso se realiza con cada uno de los capilares que se hayan corrido.
- 3.- Una vez que se obtienen los geles y están colocados en su recipiente, se les añade 1 mL del amortiguador de equilibrio para geles de poliacrilamida-SDS durante 5 minutos, cuya composición se muestra enseguida.

**AMORTIGUADOR DE EQUILIBRIO**

SDS :0%

Tris 100mM pH 6.8

Azul de bromofenol 0.6%

$\beta$ -mercaptoetanol 4%

Después se retira la solución de este amortiguador y se les vuelve a adicionar 1 mL durante otros 5 minutos. Los geles están listos para introducirlos en los geles de poliacrilamida-SDS.

**VI. Separación de proteínas por peso molecular (Segunda dimensión).**

Se prepararon los geles de acrilamida-bisacrilamida (10%-0.3%) de 1 mm de grosor para poder determinar el patrón de las proteínas separadas por punto isoeléctrico que se encontraban en las preparaciones de membranas plasmáticas (Schügger y Von Jagow, 1987).

El gel constaba de dos geles: uno separador y uno concentrador. Las cantidades y reactivos utilizados para cada uno se muestran en la Tabla X.

La preparación de los reactivos utilizados para los geles de poliacrilamida-SDS se muestra a continuación:

- a) Solución de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.938%)
- b) Amortiguador del gel:  
Tris 3 M  
SDS 0.3%  
Ajustar pH 8.9-9.0/HCl
- c) Amortiguador del cátodo:  
Tris 0.1 M  
Tricina 0.1 M  
SDS 0.1%
- d) Amortiguador del ánodo:  
Tris 0.2 M  
Ajustar pH 8.9-9.0/HCl

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla X.- Composición de los geles de poliacrilamida-SDS.

REACTIVOS	GEL SEPARADOR (μL)	GEL CONCENTRADOR (μL)
Acrilamida-Bis-acrilamida (30% <sub>v/v</sub> -0.938%)	1632	225
Amortiguador del gel TRIS:SDS pH 8.9	1632	421
Glicerol	660	—
H <sub>2</sub> O bidestilada	991	1038
Persulfato de amonio 10%*	16.5	14.0
TEMED*	1.65	1.4
Cantidad total (μL)	4933.15	1700.0

Se utilizó un estándar de proteínas con diferente peso molecular. El estándar utilizado fue el de GIBCO BRL, catálogo 10748-010, compuesto por las siguientes proteínas:

PROTEINA (Nº banda)	PESO MOLECULAR (kDa)
1.....	172.6
2.....	11.4
3.....	79.6
4.....	61.3
5.....	49.0
6.....	36.4
7.....	24.7
8.....	19.2
9.....	13.1
10.....	9.3

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con los reactivos preparados se procedió de la siguiente manera:

1. Se utiliza el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad. Se utiliza una cámara de electroforesis para minigeles. Se ensamblan las placas de vidrio con su separador de 1 mm en cada soporte, sellando los extremos inferiores con glicerina y se insertan a su vez en un aditamento incluido en el sistema, en el cual se pueden montar dos soportes, y entonces se hace la prueba de fuga con agua bidestilada.
2. Si no hay fugas, se procede a quitar el exceso de agua y se prepara el gel separador como ya se indicó y se vacía entre las dos placas de vidrio y se le añade aproximadamente 1 mL de una solución SDS 0.3% para evitar la formación del menisco. Se deja polimerizar entre 25-30 minutos. Se recomienda trabajar en una superficie previamente nivelada.
3. Se quita la solución SDS 0.3% y se prepara el gel concentrador y éste es vertido entre las placas de vidrio, se introduce enseguida el peine ya sea de dos carriles (un carril para el estándar y el otro para el capilar) o bien uno de 10 carriles y se deja polimerizar 30 minutos.
4. Se retira el peine muy despacio y se limpia el exceso de solución que no polimerizó, se llenan los pozos con el amortiguador del cátodo y se marca cada soporte con el nombre del tipo de muestra que se cargará.

5. En el pozo pequeño se carga el estándar de peso molecular (1  $\mu$ L de una dilución 1:1 en el caso de que se vaya a realizar una tinción con plata o bien 5  $\mu$ L del estándar para una tinción con Coomassie).
6. Se procede a cargar el gel del capilar que fue equilibrado como se indicó en el punto V en el pozo largo, esto se hace con ayuda de un separador de 0.75 mm, se debe tener cuidado de que todo el gel del capilar quede bien estirado y en contacto con el gel concentrador, así como tener bien identificada la orientación de éste, en mi sistema el cátodo queda del lado de donde cargo el estándar de peso molecular.

Simultáneamente se prepara un gel de poliacrilamida-SDS, en el que se cargarán las mismas muestras del ensayo de fosforilación a cada condición, separando éstas solo por peso molecular, lo cual servirá como un control de cargado.

7. Se montan los soportes en la cámara, cuidando de que queden con y sin FB<sub>1</sub> o SN en la misma cámara para que tengan las mismas condiciones de corrida.
8. Se corren las muestras a 60 V una hora y después a 90 V hasta que salga todo el colorante del gel.
9. Al término de corrida se desmontan los soportes y se sacan los geles de cada uno de éstos y se colocan en un recipiente marcado con su nombre respectivo el cual contiene la solución fijadora, ésta depende del tipo de tinción que vaya a realizarse.

## **VII. Tinción de geles con:**

### a) Nitrato de plata.

A continuación se menciona la lista de soluciones que se ocuparán:

- 1.- Metanol 50%.
- 2.- NaOH 0.13 M
- 3.- Nitrato de plata 80%
- 4.- Citrato de sodio monohidratado 2.5%
- 5.- Solución teñidora de AgNO<sub>3</sub> (Preparar fresca)  
Para 100 mL de solución (50 mL/gel):
  - 1 mL de NaOH 0.13 M
  - 1 mL de NH<sub>4</sub>OH (concentrado)
  - 1 mL de AgNO<sub>3</sub> 80%. Adicionar gota a gota y agitando constantemente, no añadir

más hasta que el precipitado café desaparezca.

6.- Solución reveladora:

Para 500 mL. 1 mL de citrato de sodio monohidratado 2.5%, 250  $\mu$ L de formaldehído (37% SIGMA).

7.- Solución fijadora y stop: Metanol 50%/CH<sub>3</sub>COOH 10%

Procedimiento:

- 1) Después de terminar la electroforesis, colocar los geles en recipientes de vidrio con la solución fijadora, dejarlos en agitación constante y lenta durante toda la noche o por lo menos dos horas. Se recomienda reusar la solución fijadora.
- 2) Lavar los geles con agua bidestilada por 15 minutos.
- 3) Lavar con metanol 50% por 30 minutos.
- 4) Lavar con agua bidestilada y formaldehído (Para 250 mL de H<sub>2</sub>Odd adicionar 125  $\mu$ L de formaldehído de SIGMA) lavar por 20 minutos.
- 5) Lavar por 20 minutos con agua bidestilada y preparar la solución teñidora.
- 6) Volver a lavar con agua bidestilada por 20 minutos.
- 7) Colocar los geles con la solución teñidora por 30 minutos.
- 8) Lavar los geles con agua bidestilada, dar varios cambios rápidos y dejarlos en agua por 15 minutos.
- 9) Decantar el agua y agregar la solución reveladora, agitar hasta que aparezcan las bandas.
- 10) Decantar la solución reveladora una vez que se haya obtenido la intensidad deseada deteniendo el revelado con la solución stop (MeOH 50%/CH<sub>3</sub>COOH 10%). Es recomendable guardar esta solución stop y reusarla solamente en este punto.
- 11) Cambiar la solución stop por agua bidestilada y secar los geles.

b) Azul de Coomassie.

A continuación se enlistan las soluciones que se ocuparon para esta tinción:

1.- Solución fijadora: CH<sub>3</sub>COOH 10%

2.- Solución teñidora:

375 mL metanol

200 mL CH<sub>3</sub>COOH

1.5 g azul de Coomassie (Brillant blue G-250)

Aforar a 950 mL con agua bidestilada.

3.- Solución desteñidora:

Etnol 46%

CH<sub>3</sub>COOH 9%

Procedimiento:

- 1) Después de haber terminado la electroforesis, se sacan los geles y se colocan en un recipiente con la solución fijadora y se dejan durante toda la noche en agitación.
- 2) Decantar la solución fijadora y añadir la solución teñidora, dejando los geles en agitación constante durante 4 horas.
- 3) Decantar la solución teñidora y añadir la solución desteñidora, además colocar una esponja pequeña en un extremo del recipiente e incubar a 37 °C con agitación constante aproximadamente entre 60-90 minutos. Revisar periódicamente a fin de evitar que se destiñan demasiado los geles.
- 4) Cambiar la solución por agua bidestilada y los geles se secan.

### **VIII. Secado de geles.**

El secado de los geles se realizó de dos maneras:

#### Método del celofán al aire:

1. Una vez que el gel fue teñido por cualquiera de los dos tipos de tinción, se decanta el agua bidestilada y se le adiciona una solución de Etanol 20%/Glicerol 10% y se deja en agitación constante durante 30 minutos.
2. Mientras se corta una hoja de papel celofán del tamaño del plato base, humedecerlo con agua y extenderlo sobre el plato base. Este plato puede ser una hoja de acrílico que tenga un marco del mismo tamaño.
3. Colocar el gel en el centro del plato base.
4. Cubrir el gel con una segunda pieza de celofán del mismo tamaño que la primera, humedecida y colocar encima el marco (es muy importante alisar y eliminar burbujas), ajustando el sistema con la ayuda de pinzas y se deja secar horizontalmente toda la noche.

#### Método con calor y vacío:

1. Colocar el gel teñido sobre una hoja de papel absorbente 3M, previamente humedecido y cubrir el gel con una hoja de papel celofán. Alisar y eliminar burbujas.
2. Recortar el celofán según el tamaño de cada gel.
3. Colocar el gel preparado sobre la hoja de papel del equipo y taparlo con la hoja de plástico del mismo.
4. Conectar y encender el vacío a 80 °C durante 1.5 h.

### **IX. Exposición de los geles bidimensionales a placas de autorradiografía.**

Después de haber secado los geles teñidos, se expusieron a una misma película para autorradiografía y se guardaron en un cassette, esto se realiza en el cuarto oscuro y se identifica la posición de geles en la película. Se coloca el cassette en una bolsa negra y se

guarda a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 15 días, esto depende del decaimiento de la marca radioactiva.

Al término de este período la película es revelada de la siguiente manera:

1. Sacar el cassette del refrigerador de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dejando que se equilibre a temperatura ambiente.
2. A partir de aquí se trabaja en ausencia de luz blanca, para ello se trabaja en el cuarto oscuro. Se coloca en una bandeja adecuada la solución reveladora de la marca Kodak, catálogo 190 1859 preparada como se indica en el instructivo de la botella y se introduce la película de autorradiografía, agitando constantemente en un período que no supere los 5 minutos.
3. Se traspasa la placa a otra bandeja que solo contiene agua y se agita durante 30 segundos.
4. Traspasar la película a una tercera bandeja que contiene la solución fijadora de la marca Kodak, catálogo 190 1859 preparada como lo indica el instructivo impreso en la botella, en agitación entre 5-10 minutos.
5. A partir de aquí se puede encender la luz blanca y se traspasa la película a otra bandeja que contiene agua.
6. Colgar la placa y dejar secar.

#### **X. Análisis de datos por densitometría.**

Después de obtener la placa de autorradiografía de los geles bidimensionales se procedió de la siguiente forma:

##### Digitalización de la autorradiografía:

1. Se enciende el equipo Fluor-X junto con la computadora.
2. Se abre la compuerta del equipo y se coloca la placa de autorradiografía en su superficie, tratando de centrar la placa.
3. Se abre el programa Quantity One y se desplaza al archivo de Fluor-S y se abre la ventana de este subprograma, apareciendo la pantalla de adquisición.
4. Se hace la selección del tipo de muestra que se desea escanear, en este caso Rayos X.
5. Las dimensiones de escaneo se dejan por default.
6. Se posiciona la imagen.
7. Se hace el enfoque de la imagen, este paso puede hacerse automáticamente o manualmente, es decir, moviendo directamente el zoom del lente.
8. Indicar el tiempo de adquisición y este se va ajustando con una preview.
9. Una vez elegido el tiempo se da la indicación de adquisición de la imagen.
10. Se guarda la imagen para su análisis posterior.

##### Análisis densitométrico:

1. Se trabaja con el programa Quantity One, se abre el archivo de la imagen digitalizada.
2. Se agranda la imagen y se van seleccionando las manchas una por una, esta selección puede ser a través de cuadros ajustados al tamaño o bien bordeando la mancha. Se

nombran y se indica el tipo de muestra que es, si es desconocida o es de fondo, para realizar este último paso se da un doble clic en la mancha seleccionada. Esto se puede hacer simultáneamente entre las dos placas autorradiográficas o trabajar una primera.

3. Se hace la selección del fondo ya sea para cada mancha o si es muy homogénea la placa se selecciona un solo fondo.
4. Se selecciona análisis de densidad y se le indican los parámetros que se desean obtener, en este caso sólo se seleccionó tipo de muestra, nombre, área y densidad de la muestra. Se presiona el botón de hacer análisis y se obtiene la tabla de resultados con los parámetros antes mencionados.
5. A cada tipo de muestra se le debe restar el valor de densidad de su fondo respectivo y entonces ya puede hacerse el análisis de comparación entre las muestras control y el de la condición, ya sea las expuestas a  $FB_1$  o a la base esfingoida esfingalina.

#### **XI. Electrotransferencia de geles bidimensionales a membranas de PVDF.**

1. Las proteínas membranales fueron separadas en geles en tiras de inmobilinas como primera dimensión y una vez así separadas, las proteínas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes en placa de grosor de 1.0 mm como se describió anteriormente. En total, se corrieron 5.1 mg de proteína membranal en 11 tiras de inmobilinas con 300-500  $\mu$ g de proteína por tira y se corrió un gel en placa para cada uno.
2. Una vez terminado el segundo corrimiento electroforético, los geles se incubaron por 20 min en buffer de transferencia (25 mM Trizma base, 192 mM glicina, 20% metanol, y 0.1% SDS).
3. Se recortó una membrana de Polivinildifluoruro (PVDF) grado secuenciación (Sequiblot PVDF Membrane for protein sequencing, 0.2  $\mu$ m, Bio-Rad Catalog 162-0184), la cual se sumergió en metanol grado HPLC.
4. Se ensambó el "emparedado" siguiente acomodando desde abajo hacia arriba: 4 capas de papel Whatman 3 mm, la membrana de PVDF, el gel (con un corte en la esquina para señalar la posición final) y otras 4 capas de papel Whatman. Estas deben ser del mismo tamaño del gel y la membrana y estar empapadas en buffer de transferencia.
5. El conjunto anterior se colocó en la superficie de una cámara de transferencia semi-seca de Pharmacia, cuidando de poner la membrana más cerca de la superficie de la cámara. Se pusieron de 4 a 6 emparedados en la cámara:

6. Se puso la tapa de la cámara y se electrotransfirió con una corriente de 0.8 mA por  $\text{cm}^2$  de membrana por 2.5 horas a temperatura ambiente.
7. Una vez terminada la transferencia, las membranas de PVDF se tiñeron con solución convencional de azul de Coomassie por 3 min y en seguida se destiñeron en solución de etanol-acético por otros tres minutos (ver tinción y destinción de geles de placa). Se escurrió el exceso de solución de las membranas y se colocaron entre hojas de papel Whatman 3 mm y se conservaron a 4°C hasta su uso. En total se obtuvieron diez membranas.

**XII. Procedimiento de secuenciación de aminoácidos del extremo amino terminal.**

Este fue realizado por el Dr. Guillermo Mendoza Hernández del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. Para ello, se recortaron por lo menos 8 manchas de cada una de las proteínas designadas como 1, 2 y 3, se eluyeron y se les aplicó la degradación de Edman.

## RESULTADOS

### 1. Determinación de las condiciones óptimas para la separación de proteínas de la membrana plasmática por peso molecular.

La técnica de separación electroforética que se utilizó fue la de geles desnaturalizantes, usando el procedimiento de Schagger y Von Jagov 1987, que separa con muy buena resolución proteínas membranales con pesos entre 100 y 10 kDa, misma que se había usado con éxito en un trabajo anterior con nuestras preparaciones membranales (Zomosa, 2000). La Figura 6 muestra la determinación de la movilidad relativa ( $M_r$ ) a partir de las distancias recorridas ( $R_f$ ) por proteínas marcadoras de peso molecular con respecto a la distancia total del gel separador, de lo cual se obtuvo la gráfica logarítmica que se ilustra y que demostró la linealidad reportada para este tipo de geles.

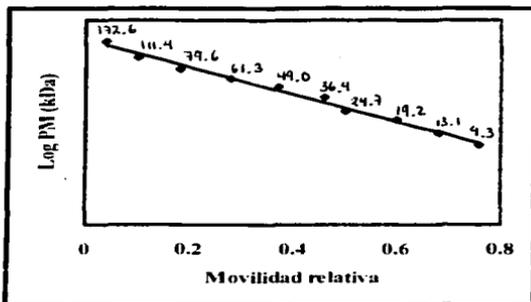


Figura 6. Gráfica de calibración para el gel de separación 10% T, 3% C. La composición del gel se describió en Materiales y Métodos en la Tabla X así como en los incisos c) y d) del punto VI que muestran la composición de los amortiguadores utilizados. Fueron graficadas las movilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular contra sus masas moleculares (indicadas con letras blancas) en una escala logarítmica. Las proteínas de peso molecular usadas como estándar fueron citadas en el punto VI de Materiales y Métodos.

**2. Ensayo de solubilidad de las vesículas de membrana plasmática.**

Como se deseaba establecer un sistema que nos permitiera hacer también la separación de las proteínas membranales de acuerdo a su punto isoeléctrico, era necesario solubilizar las proteínas con un detergente no iónico y por ello se procedió a realizar un ensayo de solubilidad en el cual se utilizaron tres diferentes detergentes incluyendo el comunmente utilizado para la electroforesis de peso molecular (SDS). El ensayo se realizó incubando las vesículas de membrana plasmática con un amortiguador de la misma composición al mostrado en Materiales y Métodos del punto V en el inciso c), determinándose la recuperación de la proteína en cada condición. Los resultados del rendimiento del ensayo se muestran en la Tabla XI.

Tabla XI. Rendimientos obtenidos en el ensayo de solubilidad. Alícuotas de 200 µg de la fracción de membrana plasmática se expusieron al amortiguador de equilibrio indicado en el inciso c del punto V de Materiales y Métodos, pero sin el azul de bromofenol y con la sustitución del detergente a evaluar, luego se centrifugaron las muestras a 100.000 g y se determinó la proteína en el sobrenadante.

<b>DETERGENTE</b>	<b>TIPO</b>	<b>% RENDIMIENTO</b>
Lauril sulfato de sodio (SDS)	Iónico	80.2%
3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS)	Zwiteriónico	76.0%
<i>n</i> -octil-β-D-glucopiranosido	No iónico	97.1%

Al analizar el patrón proteico de bandas en los geles de SDS de estas muestras se encontró que eran muy similares entre sí (dato no mostrado), con lo cual se procedió a elegir como detergente de solubilización al CHAPS, ya que a pesar de no haber mostrado el mejor rendimiento, éste fue aceptable, y ha sido usado en fracciones membranales de plantas sometidas a enfoque isoeléctrico (Hurkman, 1986) así como también se consideró la disponibilidad del reactivo.

### 3. Optimización de las condiciones para la separación de proteínas membranales por enfoque isoeléctrico (EIE).

Una vez que se optimizaron las condiciones de la separación por peso molecular y seleccionado el detergente para solubilizar las proteínas membranales, se procedió a montar la técnica de separación por enfoque isoeléctrico, para lo cual se hizo la obtención de las vesículas de la membrana plasmática que fueron concentradas y removidas del amortiguador en el que se obtuvieron por precipitación con una mezcla de solventes etanol:acetona (1:1) y resuspendidas en un amortiguador de solubilización especial para el procedimiento de enfoque isoeléctrico y cuya composición se muestra en la tabla VIII de Materiales y Métodos. Se hicieron varios ensayos modificando las cantidades de proteína a cargar en los geles de EIE en capilar descritos en el punto V de Materiales y Métodos, y las cuales fueron de 10 a 30  $\mu\text{g}$ . Los geles en capilar posteriormente fueron montados en geles de poli(acrilamida)-SDS, con lo cual se obtuvieron los geles bidimensionales, en la Figura 7 se muestra uno de los geles obtenidos, en los que se observaron alrededor de 100 manchas de proteína por análisis visual y 152 por análisis con el software PD Quest versión 6.2 de Bio-Rad.

Por otro lado, para poder asegurarnos de que estábamos teniendo una buena formación del gradiente de pH en los geles en capilar, se corrieron proteínas marcadoras de pH isoeléctrico y peso molecular, las cuales se muestran en la Figura 8. De manera horizontal se observa la separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico en un gel en capilar para EIE en el intervalo de pH de 3-10 y de manera vertical su separación por peso molecular.

Adicionalmente, este tipo de geles nos sirvió para poder determinar el pH isoeléctrico aproximado de algunas de las proteínas membranales de interés.

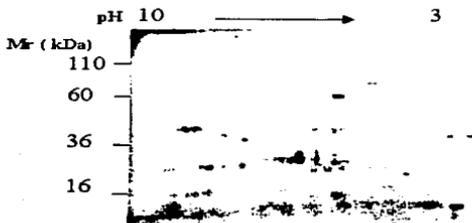


Figura 7. Optimización de las condiciones de separación en primera y segunda dimensión en proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz. Se realizó un gel en capilar para enfoque isoeléctrico (Primera dimensión), el cual fue cargado con 30  $\mu$ g de proteína. El gel se corrió 15 min a 300 V y 3.5 horas a 750 V. Posteriormente el gel fue extraído del capilar y montado en un gel de poliacrilamida-SDS (Segunda dimensión). El carril 1 fue cargado con 4  $\mu$ L de estándar de peso molecular y el carril 2 con el gel de primera dimensión. El gel se corrió 1 hora a 50 V y 2 horas a 90 V. La tinción fue con nitrato de plata.

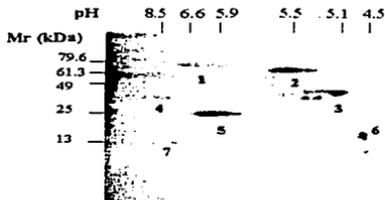


Figura 8. Patrón electroforético de proteínas estándar separadas por punto isoeléctrico y peso molecular. Se realizó un gel en capilar para EIE. Se cargó 1  $\mu$ L del estándar. El gel se corrió 15 min a 300 V y 3.5 horas a 750 V. Posteriormente se obtuvo el gel y fue montado en un gel de poliacrilamida-SDS. En el carril 1 se cargaron 4  $\mu$ L de estándar de peso molecular y la región 2 con el gel del capilar para EIE. El gel se corrió 1 hora a 50 V y 2 horas a 90 V. La tinción fue con nitrato de plata. Las 7 proteínas se muestran enumeradas y sus nombres se indican en el inciso b) del punto V de Materiales y Métodos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Ensayos de fosforilación.

Una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas de la separación de proteínas por punto isoeléctrico y por peso molecular se procedió a la realización de diferentes ensayos de fosforilación.

##### 1. Efecto de la Fumonisin B<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz.

###### a) Análisis de la separación de proteínas por EIE en un intervalo de pH de 3-10.

Uno de los primeros ensayos de fosforilación consistió en exponer las vesículas de membrana plasmática (VMP) de embriones de maíz a 10  $\mu$ M de Fumonisin B<sub>1</sub> y a condiciones de fosforilación. Primeramente el ensayo se realizó con 100  $\mu$ g de VMP y fueron cargados 30  $\mu$ g de proteína en geles en capilar para EIE en el intervalo de pH de 3-10 y posteriormente separados en geles de poliacrilamida-SDS, obteniéndose una buena separación electroforética (dato no mostrado); sin embargo, al exponer los geles bidimensionales a la película de autorradiografía no se observaba algún resultado, pese a que se exponían durante un largo tiempo. Se descartó el hecho de que pudieran estar mal las condiciones de la fosforilación, ya que al mismo tiempo que se corrían los geles bidimensionales se corría un control de cargado, el cual consistió en correr un gel de poliacrilamida-SDS con las mismas muestras  $\pm$  FB<sub>1</sub> del ensayo de fosforilación, pero que eran separadas solamente por su peso molecular. Al exponer este gel unidimensional a una película de autorradiografía y revelarla se obtuvo un patrón de fosforilación (Figura 9) muy similar al citado en la referencia de Zomosa (2000). Así como su nombre lo indica, este tipo de gel también nos ayudó a asegurarnos de que se cargaba la misma cantidad de proteína en ambas condiciones, ya que al realizarle la tinción a este gel en el que están todas las muestras, se elimina el factor de que el tiempo de revelado sea diferente para cada muestra o gel, lo cual sí puede ocurrir entre un gel bidimensional y otro, los cuales, al ser geles independientes, es difícil darles exactamente las mismas condiciones de tinción, pues una variación de segundos por ejemplo, puede dar diferente intensidad en la tinción, pudiendo llegarse a diferencias en los geles, pero no debido a la muestra aplicada, sino a su tinción.



Figura 9. Ensayo de fosforilación de proteínas de la membrana plasmática en ausencia y presencia de  $10 \mu\text{M}$  de Fumonisin  $\text{B}_1$ . Las vesículas de membrana plasmática se expusieron a condiciones de fosforilación según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS (A) el carril 2 se cargó con  $1 \mu\text{L}$  de una dilución del estándar de peso molecular (1:1), el carril 3 es la muestra sin  $\text{FB}_1$  y el carril 6 es la muestra con una concentración de  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$ . En ambas condiciones se cargaron  $20 \mu\text{g}$  de proteína. El gel se corrió 1 hora a  $50 \text{ V}$  y 2 horas a  $90 \text{ V}$ . El gel fue teñido con nitrato de plata. El gel unidimensional fue expuesto a una película de autorradiografía durante 15 días, la autorradiografía correspondiente se muestra a la derecha (B). La posición de los marcadores de peso molecular están indicados en el margen izquierdo.

Con estos resultados se procedió a aumentar las cantidades de proteína a cargar en los geles en capilar para enfoque isoelectrico, encontrando que cuando se cargaban aproximadamente  $100 \mu\text{g}$  de proteína de vesículas de la membrana plasmática en los capilares se obtenía una buena separación electroforética (Figura 10) y además al secar y exponer los geles bidimensionales a una película de autorradiografía se lograba obtener resultados visibles en la autorradiografía (Figura 11).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

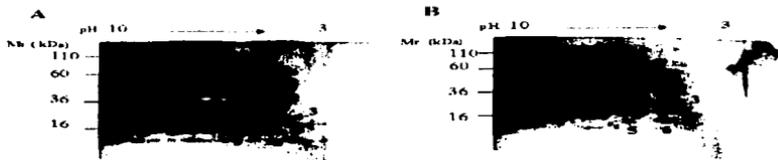


Figura 10. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz para el intervalo de pH de 3 a 10. Las VMP se expusieron a condiciones de fosforilación en ausencia (A) y presencia (B) de Fumonisina B<sub>1</sub> 10 µM según se describió en Materiales y Métodos. Para la separación de las proteínas por punto isoeléctrico en un intervalo de pH 3-10 se cargaron 100 µg de proteína en capilares, mismos que se acoplaron posteriormente a geles de poliacrilamida-SDS. La posición de los marcadores de peso molecular se encuentran indicados en el margen izquierdo de cada gel y los números con flechas indican las proteínas de interés de acuerdo a los resultados de la autoradiografía (ver Figura 11). La tinción fue con nitrato de plata.

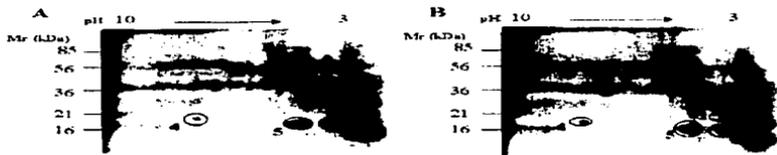


Figura 11. Efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática separadas en un intervalo de pH de 3 a 10. Las VMP se expusieron a condiciones de fosforilación en ausencia (A) y presencia (B) de Fumonisina B<sub>1</sub> 10 µM según se describió en Materiales y Métodos. Para la separación de las proteínas por punto isoeléctrico en un intervalo de pH de 3-10 se cargaron 100 µg de proteína en capilares, mismos que fueron acoplados posteriormente a geles de poliacrilamida-SDS. El tiempo de exposición fue de 15 días. Los marcadores de peso molecular están indicados en el margen izquierdo y los círculos enumerados indican las proteínas de interés.

Los resultados de la Fig. 10 muestran el patrón proteico de nuestras preparaciones, las cuales constan de alrededor de 100 proteínas. La tinción de estos geles que tienen a las proteínas marcadas nos ayudó a verificar que el patrón de migración fuera el mismo en ambas condiciones, además de ser fundamental para poder hacer la identificación de las proteínas fosforiladas. Con los resultados de la Figura 11 encontramos que de todas las

proteínas presentes en nuestras preparaciones, varias, pero no todas se estaban fosforilando con el  $AT^{32}P$ , gracias a que existía una actividad de cinasas en las membranas plasmáticas de los embriones de maíz, se puede observar en estas dos figuras que estos polipéptidos membranales se encuentran distribuidos en todo el gel. Sin embargo, solo algunos se resuelven bien y aquellos que fueron enumerados y encerrados en círculos lo hacen de manera consistente y al compararlos con los expuestos a la toxina expresan diferencias en su fosforilación, éstas diferencias pueden ser que aumenten o disminuyan la intensidad de la fosforilación.

b) Análisis de la separación de proteínas en un intervalo de pH de 4-7.

El segundo ensayo de fosforilación consistió en evaluar el patrón de fosforilación con otro gradiente de pH el cual fue de 4 a 7, ya que se deseaba obtener una mejor separación de las proteínas y poder así observar más diferencias en la intensidad de la fosforilación. Para ello lo único que fue modificado fue la concentración y tipo de anfólinas en los geles en capilar para EIE.



Figura 12. Verificación de la cantidad de proteína de la membrana plasmática de embriones de maíz para el intervalo de pH de 4 a 7. Las vesículas de membrana plasmática se fosforilaron según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS (A) y en el carril 2 se cargó con  $1\mu L$  de una dilución del estándar de peso molecular (1:1), el carril 3 es la muestra sin  $FB_1$  y el carril 6 es la muestra con una concentración de  $10\mu M$  de  $FB_1$ . En ambas condiciones se cargaron  $20\mu g$  de proteína. El gel se corrió 1 hora a 50 V y 2 horas a 90 V. El gel fue teñido con nitrato de plata. El gel unidimensional fue expuesto a una película de autorradiografía durante 15 días y la autorradiografía correspondiente se muestra a la derecha (B). La posición de los marcadores de peso molecular están indicados en el margen izquierdo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Primeramente se obtuvo el gel unidimensional que nos permitió verificar que se estuviese cargando la misma cantidad de proteína en cada condición (Figura 12). Como puede observarse, el resultado de la Fig. 12 muestra que se obtuvo el mismo patrón proteico en ambas condiciones y la autorradiografía correspondiente no permite observar muchas diferencias debido a que las proteínas sólo se separaron por peso molecular en este tipo de gel. Para apreciar las diferencias en fosforilación por acción de la adición de  $FB_1$ , en este mismo ensayo de fosforilación las muestras fueron cargadas en geles en capilar para EIE y posteriormente las proteínas fueron separadas por peso molecular obteniéndose los geles bidimensionales (Figura 13). De esta manera se pudo verificar que el patrón de migración fuese el mismo y compararlo con el patrón proteico del intervalo de pH de 3-10. Como se puede observar, la distribución de proteínas solamente se desplazó como se esperaba, de acuerdo al nuevo intervalo de pH en el gel, permitiendo obtener una mejor separación de las proteínas de interés que habían sido reconocidas en el gel con anfolinas entre pH 3 y 10. Estas proteínas se muestran enumeradas e indicadas con flechas y fueron identificadas después de haber hecho el análisis de la autorradiografía correspondiente (Figura 14), encontrando que estas proteínas se fosforilan diferencialmente por efecto de la Fumonisina  $B_1$  y a través de la acción de cinasas membranales.

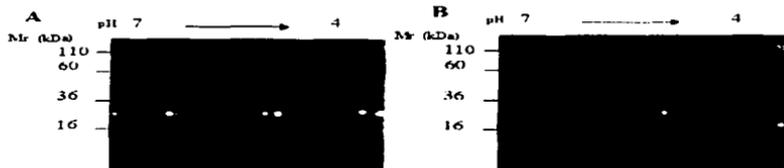


Figura 13. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz para el intervalo de pH de 4 a 7. Las VMP se expusieron a condiciones de fosforilación en ausencia (A) y presencia (B) de  $10 \mu M$  de Fumonisina  $B_1$  según se describió en Materiales y Métodos. Para la separación de las proteínas por punto isoeléctrico en un intervalo de pH 4-7 se cargaron  $100 \mu g$  de proteína en capilares, mismos que se acoplaron posteriormente a geles de poliacrilamida-SDS. La posición de los marcadores de peso molecular se encuentra indicada en el margen izquierdo de cada gel y los números con flechas indican las proteínas de interés. La tinción fue con nitrato de plata.

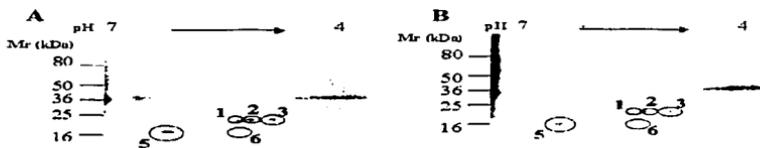


Figura 14. Efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub> en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática separadas en un intervalo de pH de 4 a 7. Las VMP se expusieron a condiciones de fosforilación en ausencia (A) y presencia (B) de 10  $\mu$ M de Fumonisina B<sub>1</sub> según se describió en Materiales y Métodos. Para la separación de las proteínas por punto isoeléctrico en un intervalo de pH de 4-7 se cargaron 100  $\mu$ g de proteína en capilares, mismos que fueron acoplados posteriormente a geles de poliacrilamida-SDS. El tiempo de exposición fue de 15 días. Los marcadores de peso molecular están indicados en el margen izquierdo y los círculos enumerados indican las proteínas de interés.

Con estos resultados se procedió a realizar un análisis densitométrico, a fin de poder apreciar de manera un poco menos cualitativa el efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub> en la fosforilación de las proteínas de la membrana plasmática, para ello se digitalizaron las autorradiografías y se obtuvieron los valores de densidad de las manchas con fosforilación diferencial por FB<sub>1</sub>, de acuerdo a lo citado en Materiales y Métodos y cuyos resultados se muestran en la Tabla XII.

Los datos densitométricos de la fosforilación diferencial por FB<sub>1</sub> fueron comparados determinando la intensidad de la mancha de proteína en ausencia de FB<sub>1</sub> y la medida en presencia de la toxina y comparándolos de dos maneras: en términos de porcentaje y en términos de la resta de los dos valores. Estos valores se presentan en las columnas respectivas de la Tabla XII. Con respecto a los valores tomados como las diferencias puede observarse que las manchas 1, 2, 3 y 6 resultan menos fosforiladas en presencia de FB<sub>1</sub> y esto se aprecia por valores positivos en la diferencia (ya que el valor sin FB<sub>1</sub> fue mayor que el valor con FB<sub>1</sub>), o bien en los valores negativos de porcentaje en los que el 100% corresponde al control (-FB<sub>1</sub>) y es mayor que el valor con la FB<sub>1</sub>.

Tabla XII. Marcaje diferencial de proteínas de la membrana plasmática con  $AT^{32}P$  en ausencia y presencia de Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>). Las vesículas de membrana plasmática obtenidas de embriones de maíz germinados 24 h se expusieron a condiciones de fosforilación sin y con FB<sub>1</sub>. Una vez obtenidos los geles bidimensionales se expusieron a películas fotográficas. A las autorradiografías resultantes se les midió la densidad de las manchas y se practicó el análisis densitométrico correspondiente, asignándose números a las manchas identificadas. Se compararon las densidades de las manchas recíprocas (sin y con FB<sub>1</sub>) para cada experimento y se calcularon las diferencias y el porcentaje de fosforilación con respecto al control, para establecer el efecto de la FB<sub>1</sub> en la intensidad de la fosforilación. Los datos se tomaron de por lo menos 7 experimentos como los de las Figuras 11 y 14.

Polipéptidos	- FB <sub>1</sub> (Ua/mm <sup>2</sup> )	+ FB <sub>1</sub> (Ua/mm <sup>2</sup> )	(-FB <sub>1</sub> )-( +FB <sub>1</sub> ) (Ua/mm <sup>2</sup> )	%	Efecto
1	22.99	21.95	1.04	-4.5	↓
	14.45	3.28	11.17	-77.3	
	12.80	8.41	4.39	-34.3	
	21.79	16.49	5.30	-24.3	
	10.26	6.99	3.27	-31.8	
	12.75	8.94	3.81	-29.8	
	x=16.12 σ=5.20	x=12.56 σ=5.7	x=3.56 σ=1.6		
2, 3	44.75	43.71	1.04	-2.3	↓
	19.49	11.02	8.47	-43.5	
	21.94	20.00	1.94	-8.8	
	33.75	31.95	1.8	-5.3	
	x=29.98 σ=10.08	x=26.67 σ=12.32	x=3.31 σ=2.99		
2	14.79	9.61	5.18	-35.0	↓
	19.61	18.52	1.09	-5.5	
3	16.44	14.67	1.77	-10.7	↓
	17.53	17.14	0.39	-2.2	
4	53.54	64.21	-10.67	19.9	↑
	10.60	23.08	-12.48	117.7	
	1.26	17.59	-16.33	1296.0	
	6.90	17.09	-10.19	147.7	
	x=18.03 σ=20.74	x=30.49 σ=19.61	x=12.42 σ=2.41		
5	75.64	78.88	-3.24	4.3	↑
	32.78	38.46	-5.68	17.3	
	19.85	30.24	-10.39	52.3	
	29.03	31.18	-2.15	7.4	
	17.01	18.35	-1.32	7.8	
	27.65	29.24	-1.59	5.8	
	x=31.99 σ=18.54	x=35.30 σ=18.85	x=3.65 σ=3.11		
6	71.00	68.04	2.96	-4.2	↓
	26.40	31.85	5.45	20.6	
	15.11	8.83	6.28	-41.6	
	20.52	18.34	2.18	-10.6	
	8.96	8.84	0.12	-1.3	
	12.42	5.57	6.85	-55.0	
	7.02	3.86	3.16	-44.9	
		x=23.06 σ=20.5	x=20.76 σ=21.26	x=3.86 σ=2.25	

De manera análoga, el efecto de aumento de la fosforilación por  $FB_1$  se expresó en las proteínas 4 y 5, en las que las diferencias corresponden a valores negativos y los porcentajes a valores positivos. Cuando se calculó la desviación estándar en los valores de las diferencias (tomando en cuenta aquellas bandas en las que había 4 o más repeticiones), las manchas con menor desviación estándar fueron la 1 y 4. Estos valores de desviación estándar indican que aunque el efecto fue reproducible la magnitud del efecto varió de un experimento a otro. Esta variación entre los experimentos pudo ser debida principalmente a un efecto del decaimiento de la marca radioactiva, a su tiempo de exposición y al tiempo de revelado, ya que aunque se procuraba dar el mismo tiempo a las dos autorradiografías, la del control y la de la muestra con  $FB_1$ , éste variaba de un experimento a otro. Es importante mencionar que la proteína reportada como 2,3 corresponde a las dos proteínas 2 y 3 debido a que se observó como una sola mancha en el intervalo de pH de 3 a 10.

De este análisis las proteínas seleccionadas candidatas a ser identificadas a través de la secuenciación del extremo amino terminal fueron 1, 2 y 3.

## II. Efecto de la esfingarina en la fosforilación de polipéptidos membranales de embriones de maíz.

a) Determinación de la elección de la base esfingoidea a evaluar en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática.

Ya que la Fumonisina B1 es una toxina que inhibe a una de las enzimas que sintetiza a la ceramida tanto en células vegetales como animales (Abbas *et al.*, 1994; Riley *et al.*, 1994 y Huwiler *et al.*, 2000), favoreciendo de esta manera la acumulación de bases esfingoideas, y considerando también que estos compuestos y la toxina comparten semejanzas estructurales, en esta tesis se quiso explorar si compuestos esfingoideos eran capaces de tener efectos similares en la fosforilación de las proteínas membranales y en particular en las mismas proteínas. Para ello fue necesario primeramente elegir la base esfingoidea, así como su concentración, probándose a la esfingarina, la fitoesfingosina, y la ceramida, ya que éstas se encuentran en plantas.

En la Figura 15 se muestran los resultados de este experimento, observándose que tanto con esfingarina como con fitoesfingosina y ceramida a una concentración de 10 y 100 nM hay un efecto general de disminución en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática. Con 1 nM de los tres compuestos aparentemente no hay un efecto en la fosforilación o bien es un efecto reducido. Sin embargo, no se pudieron observar diferencias en proteínas específicas debido a que en este experimento las proteínas fueron separadas solo por peso molecular en un gel unidimensional. Se decidió comenzar a explorar el efecto de la esfingarina, ya que esta base esfingoidea se encuentra predominantemente en plantas (Ng *et al.*, 2001), considerando evaluar otras concentraciones a las ya probadas (Figura 16), incluyendo la de 10  $\mu$ M que se había utilizado con FB<sub>1</sub>.

El resultado de la Fig. 16 muestra como con esfingarina 1 nM hay un muy ligero aumento en la fosforilación muy similar al obtenido con FB<sub>1</sub> 10  $\mu$ M, no así con 10  $\mu$ M de SN, donde se observa una clara disminución en la fosforilación, pareciera que conforme aumenta la concentración de la esfingarina la fosforilación disminuye, excepto con 1  $\mu$ M donde ésta aumenta de nuevo. En un principio se pensó que esto último se debía a un error en una de las diluciones utilizadas, pero esto se descartó, ya que se partió de una sola solución stock y de ésta se realizaron en secuencia las diluciones, evitando así un posible error en el pipeteo por lo cual se anula, además este

experimento se realizó con otra preparación y otra serie de diluciones, obteniéndose los mismos resultados.

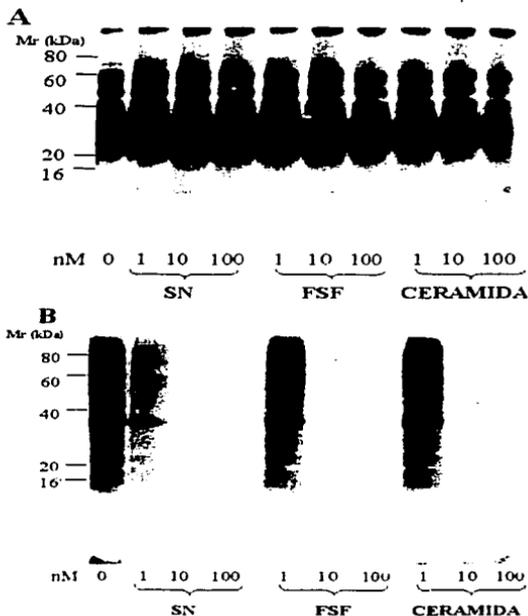


Figura 15. Efecto de distintas bases esfingoideas y ceramida sobre la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática. Las vesículas de membrana plasmática se fosforilaron según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS. El carril 1 es la muestra sin la base esfingoidea, es la muestra control; los carriles 2, 3 y 4 son las muestras con 1, 10 y 100 nM de Esfinganina (SN); los carriles 5, 6 y 7 son las muestras con 1, 10 y 100 nM de Fitoesfingosina (FSF) y los carriles 8, 9 y 10 son las muestras con 1, 10 y 100 nM de Ceramida. Todos los pozos se cargaron con 20  $\mu$ g de proteína. El gel se corrió 1 hora a 50 V y 2 horas a 90 V. La figura A es el gel teñido con nitrato de plata, la figura B es la autorradiografía del gel con un tiempo de exposición de 15 días.

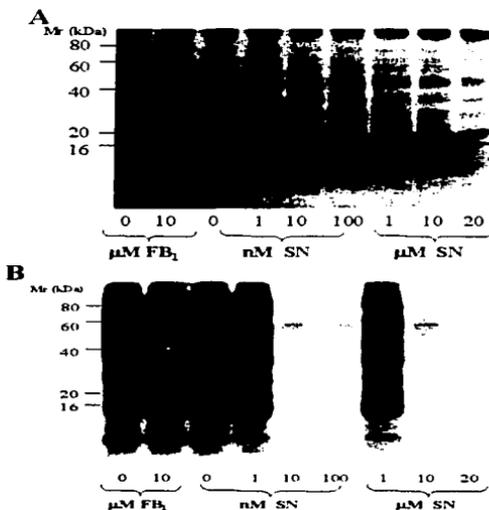


Figura 16. Efecto de la concentración de la Fumonisina B<sub>1</sub> y de la esfinganina en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática. Las VMP se fosforilaron según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS, el carril 1 se cargó con 1  $\mu$ L del estándar de peso molecular de una dilución (1:1), los carriles 2 y 4 son las muestras sin FB<sub>1</sub> y esfinganina (SN) respectivamente, son las muestras control, el carril 3 es la muestra en presencia de FB<sub>1</sub> 10  $\mu$ M, los carriles 5, 6 y 7 son muestras en presencia de SN 1, 10 y 100 nM y los carriles 8, 9 y 10 son las muestras con esfinganina 1, 10 y 20  $\mu$ M. En todos los carriles se cargaron 20  $\mu$ g de proteína. El gel se corrió 1 hora a 50 V y 2 horas a 90 V. La figura A es el gel teñido con nitrato de plata, la figura B es la autorradiografía del gel con un tiempo de exposición de 8 días.

Para conocer mejor lo que estaba sucediendo con la esfinganina, se decidió evaluar el efecto de la esfinganina 1 nM en la fosforilación de polipéptidos membranales pero ahora ya identificándolos en geles bidimensionales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

b) Efecto de 1 nM de esfingalina en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática separadas en un intervalo de pH de 3 a 10.

Una vez que se determinó la concentración a utilizar de esfingalina se procedió a realizar el ensayo de fosforilación con las vesículas de membrana plasmática en ausencia y presencia de la base esfingoidea, para lo cual también se realizó un control de cargado (Figura 17) en donde podemos ver claramente el mismo patrón de proteínas teñidas con Coomassie que se obtuvo con la FB<sub>1</sub>, observándose que entre ambas condiciones no había diferencias, no así con la autorradiografía correspondiente, en donde se puede observar un ligero aumento en la fosfoilación de las proteínas membranales en presencia de la esfingalina.

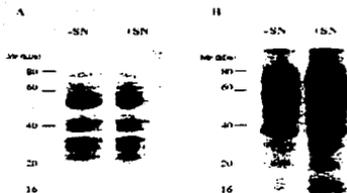


Figura 17. Ensayo de fosforilación en ausencia y presencia de la esfingalina (SN). Las vesículas de membrana plasmática se fosforilaron según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS. El carril 2 se cargó con 5  $\mu$ L del estándar de peso molecular, el carril 3 es la muestra sin SN y el carril 4 es la muestra con una concentración de 1 nM de SN. En ambas condiciones se cargaron 20  $\mu$ g de proteína. El gel se corrió 1 hora a 50 V y 2 horas a 90 V. El gel fue teñido con azul de Coomassie (A). El gel unidimensional fue expuesto a una película de autorradiografía durante 15 días, la autorradiografía correspondiente se muestra en la figura B. La posición de los marcadores de peso molecular está indicada en el margen izquierdo.

En este mismo ensayo del que se tomaron las muestras para los geles de control de cargado, se tomaron alícuotas de las mismas muestras para ser separadas por punto isoeléctrico y posteriormente de acuerdo a su peso molecular (Figura 18).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

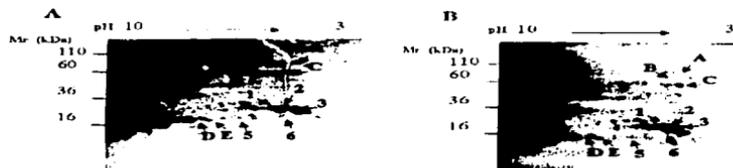


Figura 18. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz expuestas a esfingarina separadas en un intervalo de pH de 3 a 10. Las VMP se expusieron a condiciones de fosforilación en ausencia (A) y presencia (B) de 1 nM de esfingarina según se describió en Materiales y Métodos. Para la separación de las proteínas por punto isoelectrico en un intervalo de pH 3-10 se cargaron 100 µg de proteína en capilares, mismos que se acoplaron posteriormente a geles de poliacrilamida-SDS. La posición de los marcadores de peso molecular se encuentra indicada en el margen izquierdo de cada gel y los números con flechas indican las proteínas que se fosforilaron diferencialmente por esfingarina. La tinción fue con nitrato de plata.

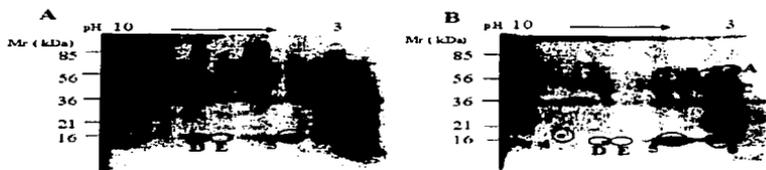


Figura 19. Efecto de la Esfingarina en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática. Las VMP se expusieron a condiciones de fosforilación en ausencia (A) y presencia (B) de Esfingarina 1 nM según se describió en Materiales y Métodos. Para la separación de las proteínas por punto isoelectrico en un intervalo de pH de 3-10 se cargaron 100 µg de proteína en capilares, mismos que fueron acoplados posteriormente a geles de poliacrilamida-SDS. El tiempo de exposición fue de 15 días. Los marcadores de peso molecular están indicados en el margen izquierdo y los círculos enumerados indican las proteínas de interés.

La Fig. 18 muestra el patrón proteico de las preparaciones membranales, el cual es prácticamente igual en ambas condiciones y al obtenido con y sin la FB<sub>1</sub>. El efecto de la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

esfingalina en la fosforilación de proteínas membranales puede visualizarse en la autorradiografía correspondiente (Figura 19). Se encontró un panorama muy similar al obtenido con la  $FB_1$ , solo que además se observaban otros cinco polipéptidos, quizás debido a que la fosforilación de éstos es más sensible a la esfingalina. Al comparar ambas condiciones, con y sin SN se observó una tendencia general de aumento en la fosforilación de las proteínas membranales.

- c) Efecto de 1 nM de esfingalina en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática separadas en un intervalo de pH de 4-7.

Del mismo modo que con la Fumonisina  $B_1$  se consideró evaluar con otro intervalo de pH y éste fue de 4 a 7 a fin de poder ver si se obtenía una mejor resolución, ya que la mayor parte de proteínas fosforiladas tenían valores de pH en esta zona. Se realizó el ensayo de fosforilación con las VMP en ausencia y presencia de esfingalina 1 nM, para lo cual se hizo la verificación de la cantidad de proteína con ayuda del gel unidimensional (Figura 20). Donde podemos observar que se conservó el patrón proteico característico de nuestras preparaciones membranales y que no hubo diferencias entre ambas condiciones.

Para la obtención de los geles bidimensionales de las mismas muestras de este experimento, se partió del mismo ensayo de fosforilación, donde las muestras sin y con esfingalina fueron cargadas en geles en capilares para EIE con anfolinas en un intervalo de pH de 4-7 y posteriormente separadas de acuerdo a su peso molecular (Figura 21) y de los cuales se obtuvo la respectiva autorradiografía (Figura 22).

La Fig. 21 nos permitió observar como se obtuvo un patrón proteico muy similar al obtenido con y sin la  $FB_1$  en el intervalo de pH de 4-7 y además el patrón de migración es igual en ambas condiciones. Con la obtención de su autorradiografía pudimos observar una mejor separación de las proteínas de interés y se observó en general una tendencia de aumento en su fosforilación, como la ya obtenida en el intervalo de pH de 3-10.



Figura 20. Verificación de la cantidad de proteína de la membrana plasmática de embriones de maíz para el ensayo del intervalo de pH de 4 a 7. Las vesículas de membrana plasmática se fosforilaron según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poli(acrilamida)-SDS. El carril 2 se cargó con 1  $\mu$ L de una dilución del estándar de peso molecular (1:1), el carril 3 es la muestra sin Esfinganina y el carril 6 es la muestra con una concentración de 1 nM de SN. En ambas condiciones se cargaron 20  $\mu$ g de proteína. El gel se corrió 1 hora a 50V y 2 horas a 90V. La tinción del gel fue con nitrato de plata (Figura izquierda). El gel unidimensional fue expuesto a una película de autorradiografía durante 15 días, la autorradiografía correspondiente se muestra a la derecha. La posición de los marcadores de peso molecular están indicados en el margen izquierdo.

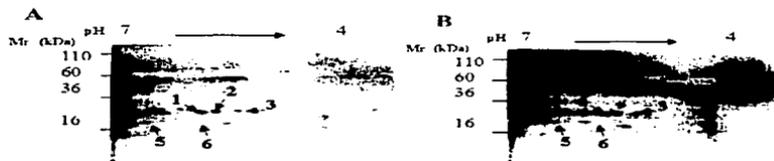


Figura 21. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz. Las VMP se expusieron a condiciones de fosforilación en ausencia (A) y presencia (B) de Esfingina 1 nM según se describió en Materiales y Métodos. Para la separación de las proteínas por punto isoelectrico en un intervalo de pH 4-7 se cargaron 100  $\mu$ g de proteína en capilares, mismos que se acoplaron posteriormente a geles de poli(acrilamida)-SDS. La posición de los marcadores de peso molecular se encuentran indicados en el margen izquierdo de cada gel y los números con flechas indican las proteínas de interés. La tinción fue con nitrato de plata.

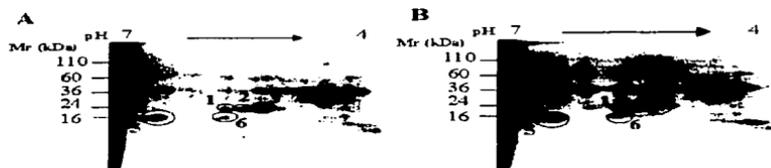


Figura 22. Efecto de la Esfinganina en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática. Las VMP se expusieron a condiciones de fosforilación en ausencia (A) y presencia (B) de 1 nM de esfinganina según se describió en Materiales y Métodos. Para la separación de las proteínas por punto isoeléctrico en un intervalo de pH de 4-7 se cargaron 100 µg de proteína en capilares, mismos que fueron acoplados posteriormente a geles de poliacrilamida-SDS. El tiempo de exposición fue de 15 días. Los marcadores de peso molecular están indicados en el margen izquierdo y los círculos enumerados indican las proteínas de interés.

A estas autorradiografías se les digitalizó y realizó el análisis densitométrico de acuerdo a lo mencionado en Materiales y Métodos obteniéndose los resultados de la Tabla XIII. En esta tabla se observa que fueron 11 las proteínas que se fosforilaron diferencialmente en presencia de esfinganina y todas aquellas proteínas de la membrana plasmática que consistentemente expresaron diferencias en su fosforilación por efecto de la esfinganina, mostraron siempre diferencias de aumento en presencia de la base. Estas diferencias se encontraron ya fuera expresando el efecto de la esfinganina en términos de porcentaje o de diferencia, como se hizo para los datos de FB<sub>1</sub> (Tabla XII), mostrándose que aunque existía variación entre los experimentos, el efecto de SN era reproducible; sin embargo, las diferencias por experimento en términos absolutos, indican un efecto más claro de la esfinganina que de la Fumonisinina B<sub>1</sub>. En el caso de los polipéptidos 2 y 3 sucedió lo mismo que con FB<sub>1</sub> en cuanto al intervalo de pH de 3 a 10.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla XIII. Análisis del marcaje diferencial de proteínas de la membrana plasmática con  $AT^{32}P$  en ausencia y presencia de estinganina (SN). Las vesículas de membrana plasmática obtenidas de embriones de maíz se expusieron a condiciones de fosforilación sin y con SN. El resto del procedimiento fue igual al de la Tabla XI. Los datos se tomaron de 5 experimentos como los de la Figura 19 y 22.

Polipéptidos	-SN (Ua/mm <sup>2</sup> )	+SN (Ua/mm <sup>2</sup> )	(-SN) - (+SN) (Ua/mm <sup>2</sup> )	%	Efecto
<b>1</b>	33.28	331.51		-5.3	↑
	13.04	14.52	1.48	11.4	
	4.71	21.44	16.73	354.8	
	25.19	50.89	25.70	102	
	8.05	12.86	4.81	59.7	
	$\lambda=16.85$ $\sigma=10.76$	$\lambda=24.93$ $\sigma=15.33$	$\lambda=12.18$ $\sigma=9.65$		
<b>2, 3</b>	42.43	42.64	0.21	0.5	↑
	12.35	23.09	10.74	87.4	
	19.08	24.69	5.61	29.4	
	$\lambda=24.62$ $\sigma=12.89$	$\lambda=30.14$ $\sigma=8.86$	$\lambda=8.18$ $\sigma=2.57$		
<b>2</b>	16.10	24.44	8.34	51.8	↑
	36.32	59.73	23.41	64.4	
<b>3</b>	18.26	27.52	9.26	50.7	↑
	37.80	55.95	18.15	48.0	
<b>4</b>	3.88	5.90	2.02	52.1	↑
	5.37	10.88	5.51	102.6	
<b>5</b>	31.07	34.17	3.10	10.0	↑
	34.33	43.83	9.50	27.7	
	29.15	31.57	2.42	8.3	
	41.28	53.28	12.00	29.1	
	9.62	13.21	3.59	37.3	
	$\lambda=29.09$ $\sigma=10.57$	$\lambda=35.21$ $\sigma=13.41$	$\lambda=6.12$ $\sigma=3.88$		
<b>6</b>	27.00	32.37	5.37	19.9	↑
	25.56	25.81	0.25	1.0	
	4.89	9.81	4.92	100.6	
	17.91	31.77	13.86	77.3	
	0.61	5.12	4.51	73.3	
	$\lambda=15.19$ $\sigma=10.71$	$\lambda=20.98$ $\sigma=11.36$	$\lambda=5.78$ $\sigma=4.43$		
<b>A</b>	6.03	15.35	9.32	154.6	↑
	3.72	17.10	13.38	359.7	
<b>B</b>	2.38	15.66	12.68	532.8	↑
	6.76	14.77	8.01	118.5	
<b>C</b>	16.23	28.57	12.34	76.0	↑
	16.16	26.16	10.00	61.9	
<b>D</b>	8.58	13.34	4.76	55.5	↑
	5.84	12.64	6.80	116.4	
<b>E</b>	4.98	12.76	7.78	156.2	↑
	8.22	9.10	0.88	10.7	

A las proteínas membranales encontradas tanto con  $FB_1$  como con Esfinganina se les determinó su peso molecular y punto isoeléctrico aproximado. aunque este último parámetro solo se calculó de acuerdo a las proteínas marcadoras de pH isoeléctrico en geles de pH de 3 a 10. ya que no se contaba con marcadores específicos para el intervalo de pH de 4 a 7. los resultados se muestran en la Tabla XIV. Puede verse que 8 proteínas tienen pesos moleculares entre 16 y 23 kDa y 3 de ellas de 63 a 89. Casi todas las proteínas fosforiladas tienen pHi ácidos. entre 4.5 y 6. habiendo una con pHi de 6.8-7. Por lo tanto, al igual que con la  $FB_1$  estos polipéptidos son candidatos para la obtención de la secuencia de su extremo amino terminal.

Todas las proteínas cuya fosforilación es estimulada por esfinganina son proteínas que son afectadas también por  $FB_1$ . Sin embargo. se presentaron 5 proteínas cuya fosforilación fue afectada por esfinganina. pero que no pudo ser detectada en presencia de  $FB_1$ . De todas las manchas detectadas. hay una proteína que parece significativa y consistentemente aumentar su fosforilación tanto en presencia de  $FB_1$  como de esfinganina y que es la proteína 5 y hay tres proteínas que disminuyen su fosforilación por efecto de la  $FB_1$  y la aumentan por efecto de la esfinganina y que son las proteínas 1. 2 y 3.

Tabla XIV. Identificación de las proteínas fosforiladas diferencialmente por adición de la Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) y la Esfinganina (SN) a la membrana plasmática. Se purificaron vesículas de membrana plasmática a partir de embriones de maíz germinados 24 h. La Fumonisina B<sub>1</sub> y la Esfinganina se adicionaron a las vesículas y se midió la incorporación de AT<sup>32</sup>P a las proteínas membranales, las cuales fueron separadas por punto isoeléctrico y peso molecular. La identificación se hizo de acuerdo a proteínas de referencia separadas en las mismas condiciones. El sentido de las flechas indica si la fosforilación de la proteína correspondiente aumentó o disminuyó en presencia de FB<sub>1</sub> o SN. Los resultados que se presentan provienen de los experimentos referidos en las Tablas XII y XIII.

PROTEINAS	PM (kDa)	PI	10 μM FB <sub>1</sub>	1 nM SN
1	21-23	5.1-4.9	↓	↑
2, 3	21-23	4.8-4.5	↓	↑
2	21-23	4.8-4.5	↓	↑
3	21-23	4.8-4.5	↓	↑
4	18-19	7.0-6.8	↑	↑
5	16-17	5.5-5.2	↑	↑
6	16-17	5.1-4.9	↓	↑
A	83-89	4.8-4.5	—	↑
B	78-84	5.1-4.9	—	↑
C	63-66	4.8-4.5	—	↑
D	16-17	6.0-5.9	—	↑
E	16-17	5.8-5.7	—	↑

### **5. Determinación de la secuencia del extremo amino terminal de polipéptidos seleccionados de acuerdo a su fosforilación diferencial por efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub> y Esfinganina.**

Una vez que se seleccionaron las proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz, cuya fosforilación se veía modificada por efecto, ya sea de la toxina producida por *Fusarium moniliforme* o por la esfinganina, para poder realizar la identificación de las proteínas a través de la secuenciación fue necesario visualizarlas por su tinción con azul de Coomassie, ya que esto aseguraba dos cosas: la primera, que las proteínas estaban en una cantidad suficiente para ser detectadas y secuenciadas y la segunda, para identificarlas por su posición con respecto a la autorradiografía. En nuestros experimentos, las proteínas sólo habían sido teñidas con la tinción con nitrato de plata y no por Coomassie, porque la tinción con plata es más sensible (del orden de 2-10 ng de proteína) que el Coomassie (que va de 0.1-1 µg) y aunque en nuestro caso se cargaron cantidades de 90 a 100 µg de proteína membranal total, debido a las dos formas de separación de las proteínas, cada polipéptido se encontraba en el gel en cantidades muy pequeñas. Un problema fue que la capacidad de nuestros capilares para enfoque isoeléctrico no era lo suficientemente grande para soportar una mayor cantidad de proteína, por lo cual se recurrió a utilizar tiras con un gel preformado conteniendo anfolinas e inmobilinas que generan un gradiente inmóvil de pH a lo largo del gel adherido a una tira plástica, asegurándose una buena separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico. Adicionalmente, este tipo de gel podía ser cargado con hasta 500 µg de proteína total. Para utilizar este sistema se realizó un ensayo de fosforilación con y sin marca radiactiva y en presencia de esfinganina 1 nM. Con estos experimentos se pretendía determinar si con 300 a 500 µg de proteína aplicada a estas tiras, se repetía el patrón obtenido con los capilares. Los resultados demostraron que efectivamente el patrón se repetía y además se logró que algunas de las proteínas de interés se pudieran observar al teñir los geles con azul de Coomassie, aunque de las 11 candidatas sólo tres fueron observables (Figuras 23 y 24).

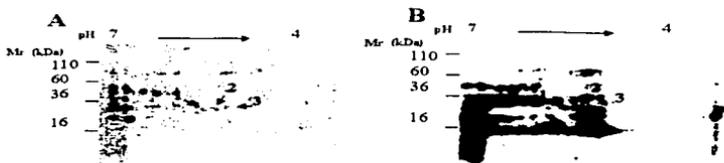


Figura 23. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz del experimento control. Las VMP se expusieron a condiciones de fosforilación en presencia de Esfinganina 1 nM pero sin  $AT^{32}P$  según se describió en Materiales y Métodos. Para la separación de las proteínas por punto isoeléctrico en un intervalo de pH 4-7 se cargaron 500  $\mu$ g de proteína en el gel en tiras de EIE, mismas que se acoplaron posteriormente a geles de poliacrilamida-SDS. El tiempo de tinción fue de 4 horas con azul de Coomassie (A) y de 2.5 horas con nitrato de plata (B). Se trata del mismo gel teñido sucesivamente con ambos procedimientos. La posición de los marcadores de peso molecular se encuentra indicada en el margen izquierdo de cada gel y los números con flechas indican las proteínas de interés.

El experimento control, en el que se expusieron las VMP a las condiciones de fosforilación habituales con  $AT^{32}P$  se hizo con objeto de verificar que las proteínas separadas en los geles en tiras y luego identificadas por tinción con azul de Coomassie en un gel de doble dimensión eran las mismas que se fosforilaban en nuestras condiciones anteriores de electroforesis en geles en capilar (Figuras 24 y 25). En este experimento se corrió de igual forma un control de cargado (Figura 26).

Con objeto de identificar a algunas de las proteínas que se fosforilaban diferencialmente con  $FB_1$  y esfinganina, intentamos establecer su secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal. Para ello seleccionamos primero a las proteínas designadas con los números 1, 2 y 3 por ser de las que se fosforilaban en presencia de la toxina y de la base esfingoidea, pero también porque esas estaban en mayor cantidad, ya que se podían teñir con azul de Coomassie, y este es un requisito indispensable para que sean recortadas y sometidas a la degradación de Edman. Había otras proteínas membranales que se fosforilaban más, particularmente la proteína 5, desgraciadamente, está presente en bajas cantidades y no es detectable por Coomassie, aunque sí por nitrato de plata.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

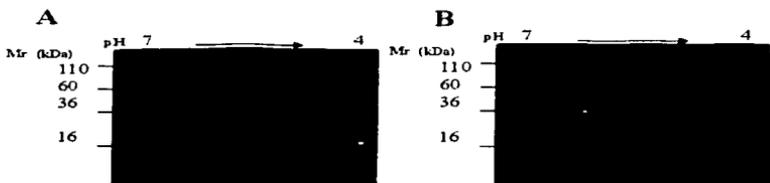


Figura 24. Geles bidimensionales de proteínas de la membrana plasmática de embriones de maíz obtenidos a partir de tiras para EIE. Las VMP se expusieron a condiciones de fosforilación en ausencia (A) y presencia (B) de Esfinganina 1 nM según se describió en Materiales y Métodos. Para la separación de las proteínas por punto isoeléctrico en un intervalo de pH 4-7 se cargaron 500  $\mu$ g de proteína en un gel de EIE en tiras plásticas, mismas que se acoplaron posteriormente a geles de poliacrilamida-SDS. El tiempo de tinción fue de 4 horas con azul de Coomassie (A). La posición de los marcadores de peso molecular se encuentra indicada en el margen izquierdo de cada gel y los números con flechas indican las proteínas de interés.

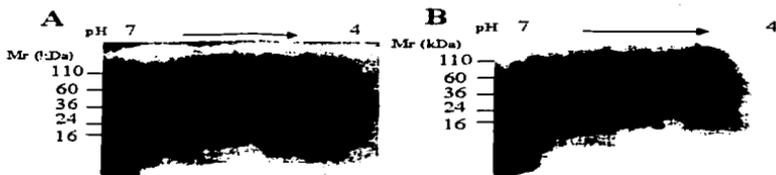


Figura 25. Efecto de la Esfinganina en la fosforilación de proteínas de membrana plasmática obtenidas a partir de tiras para EIE. Las VMP se expusieron a condiciones de fosforilación en ausencia (A) y presencia (B) de Esfinganina 1 nM según se describió en Materiales y Métodos. Para la separación de las proteínas por punto isoeléctrico en un intervalo de pH de 4-7 se cargaron 500  $\mu$ g de proteína en tiras, mismas que fueron acopladas posteriormente a geles de poliacrilamida-SDS. El tiempo de exposición fue de 30 días. Los marcadores de peso molecular están indicados en el margen izquierdo y los círculos enumerados indican las proteínas de interés.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

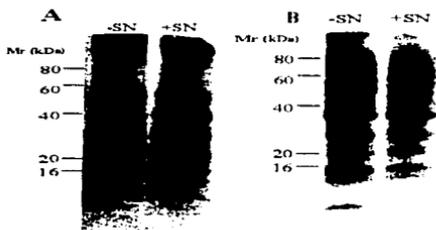


Figura 26. Verificación de la cantidad de proteína de la membrana plasmática de embriones de maíz. Las vesículas de membrana plasmática se fosforilaron según se describió en Materiales y Métodos. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS (A). El carril 2 se cargó con 1  $\mu$ L de una dilución del estándar de peso molecular (1:1), el carril 3 es la muestra sin Esfinganina y el carril 4 es la muestra con una concentración de 1 nM de SN. En ambas condiciones se cargaron 20  $\mu$ g de proteína. El gel se corrió 1 hora a 50 V y 2 horas a 90 V. El tiempo de tinción fue de 2.5 horas con nitrato de plata. El gel unidimensional fue expuesto a una película de autorradiografía durante 15 días, la autorradiografía correspondiente se muestra a la derecha (B). La posición de los marcadores de peso molecular está indicada en el margen izquierdo.

Desgraciadamente, una proteína teñida por plata no se puede someter al procedimiento de secuenciación. Este se puede iniciar a partir de manchas de proteínas que una vez que fueron separadas, en nuestro caso por enfoque isoeléctrico y por peso molecular, se transfieren electroforéticamente a una membrana de PVDF en la que se tiñen con azul de Coomassie. La Fig. 27 muestra una de las 11 membranas de PVDF teñidas que fueron obtenidas a partir de otros tantos geles. A partir de por lo menos 8 de ellas se recortaron las bandas 1, 2, y 3 para ser eluidas y sometidas al procedimiento de secuenciación. Desgraciadamente, ninguna de las tres dio señal de aminoácidos en los ciclos de degradación de Edman. Al parecer, tenían el grupo amino libre bloqueado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

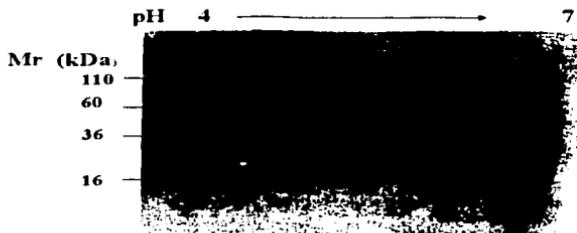


Figura 27. Membrana de PVDF teñida con azul de Coomassie. 500  $\mu$ g de proteína membranal fueron separados en una tira de enfoque isoeléctrico con inmobilinas en un intervalo de 4-7. Al terminar el electroenfoque de las proteínas en las tiras, éstas se colocaron sobre un gel en placa al 10% de acrilamida para que las proteínas se separaran de acuerdo a su peso molecular. Al terminar esta segunda electroforesis, el gel en placa se transfirió a una membrana de PVDF y se tiñó con azul de Coomassie como se describe en Materiales y Métodos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSION

Los mecanismos moleculares de defensa de la planta ante el ataque de patógenos no están bien entendidos (Agrios, 1997; Knogge, 1998; Somssich y Hahlbrock, 1998). Un enfoque experimental para tratar de dilucidarlos es trabajar con componentes moleculares tanto de la parte del patógeno, como de la de la planta. La exposición de unos a los otros constituye un sistema experimental que puede arrojar resultados que contribuyan a entender a los factores involucrados en este fenómeno. Considerando que la membrana plasmática es una de las primeras barreras celulares a las que se enfrenta el patógeno (Agrios, 1997; Scheel, 1998; Somssich y Hahlbrock, 1998), es importante conocer la participación de esta membrana ante la presencia del patógeno. Estos estudios se ven facilitados técnicamente por la posibilidad de obtener una fracción subcelular enriquecida en vesículas de membrana plasmática.

En este trabajo hemos utilizado a la Fumonisina B<sub>1</sub>, una toxina producida por el hongo *Fusarium moniliforme*, como la molécula del patógeno que puede inducir cambios en la membrana plasmática de la célula hospedera. en este caso, las células del embrión de maíz en germinación. Este trabajo planteó su hipótesis con base en la suposición de que la FB<sub>1</sub> representa una señal para la planta y de que podría ser reconocida por algunos componentes de la membrana plasmática como receptores, o enzimas como las cinasas, de tal manera que al interactuar con éstos, la señal podría ser transducida a través de segundos mensajeros y resultar en una respuesta de defensa o bien, en el caso de que los mecanismos de defensa estuvieran ausentes o fueran insuficientes, en la manifestación de la enfermedad.

Específicamente, en el presente trabajo se ha considerado la posibilidad de que la célula embrionaria del maíz responda a la FB<sub>1</sub> a través de mecanismos que involucren la estimulación de cinasas membranales, para lo cual se realizaron diferentes experimentos cuya finalidad fue la de lograr la identificación de aquellos polipéptidos que se fosforilaban diferencialmente por efecto de la toxina o por compuestos de naturaleza esfingoidea, en especial de las bases esfingoideas que son compuestos que se acumulan por acción inhibitoria de la FB<sub>1</sub> sobre la ceramida sintetasa.

La identificación de las proteínas blanco de las cinasas se llevó a cabo de acuerdo al punto isoeléctrico y peso molecular de las proteínas y se intentó hacer la secuenciación de la región del extremo amino terminal de por lo menos tres de ellas.

Por la literatura se tiene conocimiento de la fosforilación en proteínas de la membrana plasmática en plantas, por citar algunos casos podemos mencionar el estudio con cultivos en suspensión de células de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) (Vera-estrella *et al.*, 1994I, 1994II y Xing *et al.*, 1996), en raíz de remolacha (*Beta vulgaris* L.) (Baizabal y González de la Vara, 1994, 1997 y Raya y González de la Vara, 2001) y en raíz de maíz (*Zea mays* L.) (De Nisi *et al.*, 1999). La fosforilación de proteínas de membrana es un fenómeno celular de regulación de la actividad enzimática muy frecuente, que abarca tanto un gran número de sustratos proteicos como de cinasas membranales, aunque también las hay solubles que fosforilan sustratos membranales. La heterogeneidad tanto de enzimas como de sustratos involucra una variedad en pesos moleculares, en el tipo de residuos fosforilados, y en los requerimientos de las reacciones mediadas por las cinasas (Romeis, 2001). En este trabajo se usaron fracciones de membrana plasmática aisladas con un 70-80% de pureza. El antecedente directo de este trabajo fue la tesis de Zomosa *et al.*, (2000), en la que se detectó la actividad de cinasas endógenas de la membrana plasmática, determinando los pesos moleculares aproximados de las proteínas fosforiladas de acuerdo a su migración electroforética en geles de poliacrilamida-SDS. En la presente tesis, con objeto de lograr una identificación de las proteínas blanco de la actividad de cinasas, se procedió a realizar una identificación más detallada haciendo una separación bidimensional por punto isoeléctrico y peso molecular. Los controles realizados con proteínas marcadoras demostraron que la técnica proporcionaba resultados confiables y aseguraba una buena separación electroforética.

En todos los ensayos en los que las vesículas de la membrana plasmática fueron expuestas a Fumonisina B<sub>1</sub> o a compuestos esfingoideos y a condiciones de fosforilación, se obtuvo siempre el control de cargado, el cual consistió en un gel unidimensional de separación de las proteínas por peso molecular en los que se cargaron las muestras control y las tratadas.

Estos geles sirvieron para verificar que en las preparaciones membranales usadas el patrón proteico fuese el mismo tanto cualitativa como cuantitativamente y así validar debidamente que el efecto encontrado en la fosforilación de una proteína se debiera a un efecto del tratamiento y no a la cantidad de proteína aplicada a los geles. La comparación entre los patrones de las membranas control y tratadas ayudó a comprobar que el patrón de migración (movilidad, número y cantidad de las bandas de proteína) fuese el mismo en las condiciones experimentales comparadas y además sirvió para identificar a aquellas proteínas que estuvieran siendo fosforiladas. Por otra parte, con la separación de las proteínas en los geles bidimensionales (en los que las proteínas se sometieron primero a una separación de acuerdo a sus puntos isoeléctricos en un intervalo de pH de 3 a 10 o bien de 4 a 7 y subsecuentemente a una separación por peso molecular), se encontró que el patrón proteico de nuestras preparaciones de vesículas de membrana plasmática, constaba de alrededor de 100 proteínas detectadas visualmente, número que por identificación de acuerdo al programa PDQuest se elevó a 180. Estos valores coinciden con lo reportado en la literatura para membranas plasmáticas de raíz de cebada (Hurkman, 1986). Para observar el patrón de fosforilación de las proteínas, los geles obtenidos fueron expuestos a una misma película de autorradiografía, con el fin de realizar un tiempo de revelado simultáneo para las muestras control y tratadas. El análisis de las autorradiografías resultantes reveló que de todos los polipéptidos presentes en las preparaciones, sólo algunos se fosforilaban, y que incluían proteínas desde bajo hasta alto peso molecular, con pHis isoeléctricos ácidos y básicos. Pese a tener buena resolución en las separaciones de las proteínas tanto en los intervalos de pHi de 3 a 10 como de 4 a 7, hubo algunas microzonas del gel en las que las proteínas se veían asociadas con otras muy cercanas. Considerando lo anterior, solo aquellas proteínas que se fosforilaron diferencialmente (esto es, que aumentaban o disminuían la intensidad de su fosforilación) de una manera reproducible de un experimento a otro en presencia de la Fumonisina B<sub>1</sub> o la esfinganina y que estaban bien separadas, fueron seleccionadas y se les asignó un número de identificación. Cabe mencionar que no hubo aparición o desaparición de algún polipéptido fosforilado por efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub> o la esfinganina, sino que lo que se apreció fueron cambios discretos que se manifestaron como aumento o disminución en la fosforilación de algunas proteínas.

Es importante mencionar que si bien en nuestras preparaciones de vesículas de membrana plasmática observamos una fosforilación basal debida a la participación de cinasas endógenas, cabe la posibilidad de que durante el procedimiento de purificación de las membranas exista algún(os) componente(s) que pudiera estar activando a las cinasas o bien fosfatasa. A este respecto sería recomendable realizar algunos experimentos como hacer la purificación de membranas con un método diferente como el que utilizan gradientes de sacarosa y realizar el ensayo de fosforilación con estas VMP para comparar posteriormente su patrón de fosforilación con el obtenido para nuestras membranas obtenidas por el sistema de partición de fases. Otro experimento que ayudaría a dar luz sobre la fosforilación basal sería hacer un ensayo de fosforilación con el homogenado total.

Una preparación de VMP de ejes embrionarios, permitirá adentrarse al origen de las cinasas: si éste era el de membranas plasmáticas del escutelo o del eje embrionario.

En el caso del aumento de fosforilación, este resultado sugiere que la FB<sub>1</sub> o la esfinganina promovieron la unión del grupo fosfato a sitios de proteínas que no estaban fosforilados a través de una estimulación de cinasas membranales. En aquellas proteínas que disminuyen su fosforilación es posible que sea debido a fosfatasa activadas por la toxina o el compuesto esfíngoideo. Es probable que algunos de los polipéptidos membranales que puedan ser fosforilados no sean marcados con el AT<sup>32</sup>P debido a que cuando se realizó el ensayo de fosforilación estos sitios ya habían sido fosforilados con ATP endógeno (y por lo tanto no radiactivo). Para evidenciar estos sitios sería recomendable hacer un ensayo de fosforilación de las membranas habiéndolas tratadas previamente con fosfatasa. Para ejemplificar la importancia que tiene el realizar este ensayo podemos mencionar un estudio previo realizado con cultivos de suspensiones de células de tomate, en donde se expusieron las membranas plasmáticas de estas a evocadores de *Cladosporium fulvum* resultando en una rápida defosforilación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática mediada por una fosfatasa, llevando a un incremento significativo en la actividad de la enzima y a la subsecuente acidificación del medio extracelular (Vera-Estrella *et al.*, 1994).

Para tener un mejor análisis y poder observar las diferencias en la fosforilación de manera cuantitativa se realizó un análisis densitométrico de todas las autoradiografías, encontrando

que 6 proteínas se fosforilaron diferencialmente y fueron designadas con números. La proteína 1 con un peso molecular entre 21-23 kDa y punto isoeléctrico de 5.1-4.9, las proteínas 2 y 3 con PM entre 21-23 kDa y ambas con pHi de 4.8-4.5, la proteína 4 con PM de 18-19 kDa y pHi de 6.8-7.0 y los polipéptidos 5 y 6 con pesos moleculares de 16-17 kDa y pHi de 5.2-5.5 y de 4.9-5.1 respectivamente. Los resultados sugieren que las proteínas 4 y 5 aumentaron su fosforilación y los polipéptidos 1, 2, 3 y 6 la disminuyeron por efecto de la Fumonisina B<sub>1</sub>.

Un experimento que sería interesante evaluar es el de la adición *in vivo* de la FB<sub>1</sub> a los embriones de maíz, obtener las vesículas de membrana plasmática, y hacer el ensayo de fosforilación *in vitro* (como en esta tesis) y hacer la separación bidimensional y comparar el patrón proteico y de fosforilación con el obtenido en este trabajo. Una variante de este experimento sería el marcaje de las proteínas membranales *in vivo* añadiendo <sup>32</sup>P a los embriones de maíz con y sin los compuestos esfingoideos y obteniendo las vesículas de membrana plasmática ya marcadas para analizar sus patrones de fosforilación. Ambas modalidades darían información sobre la participación de otros componentes celulares en la respuesta a Fumonisina B<sub>1</sub> y a la base esfingoidea y su interacción con la fosforilación de las proteínas de la membrana plasmática.

Debido al efecto de la FB<sub>1</sub> en el metabolismo de los esfingolípidos, fue conveniente evaluar el efecto de dos bases esfingoideas: la esfinganina y la fitoesfingosina, mismas que se acumulan cuando la FB<sub>1</sub> inhibe a la ceramida sintetasa (Abbas *et al.*, 1994; Huwiler *et al.*, 2000 y Riley *et al.*, 1994), y de la ceramida, compuesto esfingoideo que es originado a partir de la esfinganina, por lo que se realizaron diversos experimentos. El primero de ellos fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de esfinganina y fitoesfingosina, así como de ceramida en el ensayo de fosforilación de las proteínas membranales, haciendo la separación de éstas sólo por peso molecular. Se encontró una clara disminución en la fosforilación con 10 y 100 nM de los compuestos esfingoideos y no así con 1 nM, concentración en la que no se observaron diferencias con respecto al control, si bien la separación de proteínas fue solo por peso molecular, en la cual pueden no hacerse cambios evidentes en la fosforilación de proteínas en pequeñas cantidades. El efecto de la esfinganina se exploró con más detalle, ya que en el laboratorio se obtuvieron datos que indicaron que cuando los embriones se exponían a la Fumonisina B<sub>1</sub> *in vivo* había una

elevación de 7 veces de esfingalina en la membrana plasmática comparada con el control (Gutiérrez-Nájera, 2003). Se encontró que con 1 nM no hubo una clara diferencia respecto al control, pero que conforme aumentaba la concentración de la base, la fosforilación disminuía, habiendo una excepción con 1  $\mu$ M, con la que se observaba un aumento en la fosforilación. Este efecto de la concentración 1  $\mu$ M de esfingalina en la fosforilación no es fácil de explicar, y se requieren hacer más experimentos para caracterizar mejor el efecto de la esfingalina sobre la reacción de fosforilación de proteínas de la membrana plasmática, desde determinar requerimientos de calcio, tiempo de exposición y explorar concentraciones de la base inclusive por debajo de las ya probadas. Sin embargo, se decidió explorar con más detalle el efecto de 1 nM de esfingalina haciendo la separación de las proteínas membranales de acuerdo a su pH isoelectrico y peso molecular.

Se encontró que se obtenía el mismo patrón proteico tanto entre la muestra control como en la expuesta a la esfingalina, al igual que lo obtenido con los experimentos realizados con la FB<sub>1</sub>, lo cual es lógico, puesto que al ser un ensayo *in vitro* con las membranas aisladas, no se cuenta con toda la maquinaria celular para poder observar la aparición de alguna proteína (por biosíntesis), o la desaparición de algunas otras (por degradación), como consecuencia de la acción de la toxina o del compuesto esfingoideo. Sin embargo, en el caso de la degradación, esta última posibilidad podría haber, si el compuesto tuviera un efecto sobre alguna proteasa, las cuales pueden estar en las preparaciones de vesículas de membrana plasmática; si bien en la obtención de éstas se emplean varios inhibidores de proteasas. En las autorradiografías se logró apreciar claramente el efecto de la esfingalina en la fosforilación de las proteínas membranales, encontrándose que además de presentarse las seis proteínas que se fosforilaron consistente y diferencialmente con la FB<sub>1</sub>, se observaron otras cinco y que estas once proteínas expresaron diferencias en su fosforilación solamente en el sentido de un aumento muy claro. Las proteínas membranales cuya fosforilación fue estimulada fueron ocho con pesos moleculares entre 16 y 23 kDa y tres entre 63 y 89 kDa, además de presentar pH isoelectricos acídicos entre 4.5 y 6.0 y una con un pHi de 6.8-7. Quedó muy claro con el análisis densitométrico que, al compararse los porcentajes de fosforilación con respecto a los obtenidos con la Fumonisina B<sub>1</sub>, los de la esfingalina fueron mayores. Esto indica que la fosforilación y por tanto las cinasas responsables de ésta, son más sensibles a la esfingalina que a la FB<sub>1</sub>, lo cual podría tener más sentido

fisiológico porque la esfingarina es un compuesto endógeno de la célula embrionaria a diferencia de la toxina que no lo es. Un efecto de concentraciones tan bajas de esfingarina sobre la fosforilación de proteínas resulta muy interesante, pues las evidencias en otros sistemas celulares indican que esta base es un segundo mensajero en sistemas de transducción de señales, el estudio de la esfingosina-1-fosfato (S1P) que juega un papel de mediador en la regulación de la turgencia de las células guarda por el ácido abscísico en hojas de *Commelina communis* (Ng *et al.*, 2001) y el papel de S1P en la regulación de las actividades de canales de iones en protoplastos de células guarda de *Arabidopsis* (Fan *et al.*, 2002), lo ejemplifican. También se han considerado como segundos mensajeros y moduladores intracelulares en sistemas de animales al inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) (Nelson y Cox, 2000), diacilglicerol, esfingosina, lisoesfingolípidos y ácidos grasos insaturados (Oishi *et al.*, 1990). Resulta atractivo que en nuestro caso, la esfingarina pudiera estar actuando como un elemento en la transducción de la señal de respuesta a un patógeno, representado en este modelo, por la exposición a FB<sub>1</sub>, ya que en éste, la concentración a la cual se obtuvieron resultados fue 1 nM de esfingarina, mientras que en otros sistemas se han utilizado concentraciones mayores, por citar algunos ejemplos tenemos que en células epiteliales de riñón de cerdo al utilizar una concentración de 1-3 µM de esfingarina se obtuvo una inhibición del crecimiento celular y un incremento en la muerte celular (Yoo *et al.*, 1996) y en otro estudio realizado con fibroblastos de ratón al utilizar concentraciones de 5-100 µM de esfingosina y de su forma metilada N,N'-dimetil-esfingosina, se observó la activación de cinasas de proteína dependientes de esfingosina (SDKs) (Megidish *et al.*, 1999) y finalmente en un sistema con hojas de *Commelina communis* utilizaron concentraciones de 4-6 µM de esfingosina-1-fosfato observando la promoción del cierre de la apertura estomatal y concentraciones de 6 y 50 µM de esta misma base produjo un incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Ng *et al.*, 2001). Por los resultados anteriores resultaba muy interesante identificar a las proteínas fosforiladas diferencialmente para saber si estaban implicadas en reacciones de defensa contra patógenos o bien en sistemas de transducción de señales relacionadas. En esta tesis, de las seis y once proteínas cuya fosforilación se encontró que fue diferencial por efecto de

la Fumonisina B<sub>1</sub> y de la esfinganina respectivamente y que eran candidatas a secuenciarse, solamente se eligieron los polipéptidos 1, 2 y 3, debido a que fueron los únicos que lograron observarse con la tinción de Coomassie al cargar aproximadamente 500 µg de proteína en geles en tiras para enfoque isoelectrico, lo cual implicaba que estaban en suficiente cantidad para practicárseles la degradación de Edman. El propósito era que una vez conocida la secuencia de aminoácidos, se comparara con las secuencias en bancos de datos para identificarlas. Es probable que entre estas proteínas se encontrarán algunas relacionadas con la respuesta de defensa o incluso alguna (s) cinasa (s) que se estuvieran autofosforilando. Desgraciadamente, el análisis practicado a las proteínas designadas como 1, 2 y 3 fue infructuoso, pues no hubo señal de ningún aminoácido en los ciclos de secuenciación, lo cual sugiere que no hay un extremo amino libre. Una manera de resolver este problema es someter a las proteínas a un análisis por MALDI-TOF/MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry), ya que esta técnica es más sensible, requiere a la proteína separada en el gel y no transferida a otra matriz y puede ser revelada para su identificación a través de una tinción con nitrato de plata. Una fragmentación proteolítica de la proteína, la purificación de los fragmentos parciales y la secuenciación subsecuente, serían también una solución, pero el costo y la cantidad de proteína requerida, también serían superiores al análisis por espectrometría de masas.

Uno de los aspectos que no se abordaron en este estudio y que es importante, es determinar el tipo de cinasas responsables que están participando en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática. Para ello, se pueden utilizar inhibidores o estimuladores específicos de cinasas y extender este estudio a probar fosfatases comerciales. Este enfoque ha sido útil para establecer la identidad y características de varias cinasas membranales como las dos cinasas de proteína que regulan la fosforilación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de suspensiones de células de tomate, en donde se determinó la participación de una cinasa C de proteínas (PKC) y una cinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina (CaM) (Xing *et al.*, 1996) así como también podemos mencionar el estudio realizado en raíz de maíz, en el que se encontró una cinasa dependiente de calcio, la cual regula la fosforilación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática (De Nisi *et al.*, 1999).

El mecanismo por el cual la Fumonisina B<sub>1</sub> y los compuestos esfingoideos ejercen la acción sobre la actividad de cinasas membranales observada en este trabajo, no puede ser determinado por los experimentos aquí reseñados. Las cinasas podrían estar teniendo una interacción directa con la FB<sub>1</sub> o con los compuestos esfingoideos, pero no puede descartarse que haya elementos también localizados en la membrana que modulen esta interacción. Tampoco se puede saber cual es la relación que tienen estos eventos de fosforilación con otros pasos de un posible sistema de transducción de señales, si es que lo hay. No se puede descartar que de las proteínas fosforiladas alguna(s) puedan ser las mismas cinasa(s) que tienen capacidad de autofosforilación. Sin embargo, si la aplicación de la FB<sub>1</sub> lleva a la acumulación de bases esfingoideas en la membrana plasmática (Huwiler *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 1996), es posible que los efectos en la fosforilación de proteínas que encontramos con esfingánina añadida a las membranas, sean los que se presentan naturalmente cuando la FB<sub>1</sub> se internaliza en las células del embrión e inhiba a la ceramida sintetasa.

Se han descrito algunas cinasas de proteínas en plantas que participan en la respuesta a patógenos como en el arroz *Xa-21* y trigo *Lr10* que contienen la clase de genes *R* (gené de la resistencia), que codifican a cinasas que funcionan como receptores con un dominio extracelular, un dominio en la membrana y un dominio de cinasa serina/treonina en el citosol y otras que están involucradas en pasos posteriores, una vez que la señal fue reconocida y es ahora transmitida en la célula del hospedero como el caso del gen *Pto* del tomate que es la única clase de gen *R* que codifica una proteína citosólica con actividad de cinasa serina/treonina. Algunas de las proteínas que interactúan con la cinasa *Pto* han sido identificadas. El gen *Pti1* ("Pto-interactuando 1") codifica para una cinasa serina/treonina que es probablemente el sustrato hacia debajo de *Pto*; otras tres proteínas, codificadas por los genes *Pti4*, *Pti5* y *Pti6*, se han encontrado que interactúan con la cinasa *Pto*. Cada una de las tres proteínas pueden ser factores transcripcionales que actúan sobre la región promotora de un largo número de genes relacionados a la patogénesis (PR). En perejil, el reconocimiento de evocadores no específicos por la célula hospedera puede disparar una vía de señalamiento mediada por una cinasa de proteínas activada por mitógeno (MAPK) (Blumwald *et al.*, 1998; Romeis, 2001). También ha sido reportada la afluencia de calcio y

la actividad de cinasas de proteínas por inducción de evocadores en varios pato-sistemas como una de las respuestas tempranas requeridas para una señalización hacia abajo exitosa. a este respecto las cinasas de proteína dependientes de calcio (CDPKs) son estructuras ideales para detectar cambios en las concentraciones intracelulares de este catión. Entre algunos genes que codifican para MAPKs que se activan durante la respuesta de la planta hacia evocadores o patógenos podemos mencionar *WIPK*, *SIMK*, *AtMAPK3* y *ERMK* que corresponden a tabaco, alfalfa, *Arabidopsis* y perejil respectivamente, y *SIPK*, *SAMK* y *AtMAPK6* para tabaco, alfalfa y *Arabidopsis* han sido caracterizados. El señalamiento de cinasas MAP es complejo, ya que existen familias de genes para cada miembro de MAPK, MAPKK y MAPKKK de la cascada de fosforilación. Estas enzimas son multifuncionales y pueden ser activadas por evocadores relacionados con el patógeno, ya sea específico o no de raza, así como ante un estímulo del ambiente: algunas vías de cinasas MAP son utilizadas en paralelo ante un simple estímulo de elicitación (Romeis, 2001). Sin embargo, las MAP cinasas son proteínas solubles que estarían ausentes en nuestras preparaciones membranales, pero no puede descartarse que la acción de las cinasas membranales que hemos detectado tengan una relación hacia abajo de una posible vía de señalización.

En este trabajo hemos identificado la actividad de cinasas que responden a la Fumonisin B<sub>1</sub> y a esfinganina. Todas ellas han sido medidas en presencia de Calcio, pero es posible que no todas respondan a Calcio, ya que el requerimiento de calcio fue establecido para la fosforilación de proteínas membranales cuando las proteínas fueron identificadas solo en geles de separación por peso molecular (Zomosa, 2000). El presente trabajo establece las bases para una caracterización más detallada que pueda describir una relación entre la FB<sub>1</sub>, los compuestos esfingoideos y la participación de cinasas. La identificación de los polipéptidos fosforilados es clave para entender esta relación y establecer un posible papel de los compuestos esfingoideos en la respuesta a patógenos.

**CONCLUSIONES**

- Hemos identificado a seis proteínas de la membrana plasmática que se fosforilan diferencialmente por exposición a FB<sub>1</sub> y a once por esfinganina.
- No se puede determinar si alguna de estas proteínas pueden ser cinasas que se autofosforilan o si podrían ser proteínas relacionadas con la respuesta de la célula embrionaria ante la presencia de la toxina del patógeno.
- El efecto de estimulación de esfinganina sobre la actividad de fosforilación observado puede estar relacionado con un papel mediador de la base en la respuesta al patógeno.
- Quedan por determinar los mecanismos por los cuales la FB<sub>1</sub> y la esfinganina ejercen los efectos observados de estimulación / inhibición en la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática.
- Es probable que alguna(s) de la(s) fosforilación(es) observadas en este trabajo puedan ser el inicio de alguna(s) cascada(s) de señalización de la célula de la planta ante la presencia de la toxina y por lo tanto del patógeno.

## PERSPECTIVAS

- Queda por determinar el tipo de cinasas que están participando en las fosforilaciones observadas.
- Una vez identificadas las proteínas fosforiladas se pueden caracterizar los sitios de fosforilación con anticuerpos específicos o bien por fragmentación y secuenciación de la fosfoproteína. Con el sistema de tiras de separación por pHi. se pueden correr más rápidamente y en mayor cantidad muestras con diferentes tratamientos.
- Caracterizar las condiciones en las que la esfingánina tiene un efecto de activación de cinasas.
- Determinar la relación que pueda(n) tener esta(s) cinasa(s) con la probable respuesta de la célula embrionaria ante la toxina producida por su patógeno.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, H. K., Paul, R. N., Boyette, C. D., Duke, S. O. y Vesonder, R. F. Physiological and ultrastructural effects of fumonisin on jimsonweed leaves. *Can. J. Bot.* 1992, 70:1824-1833.
2. Abbas, H. K., Tanaka, T., Duke, S. O., Porter, J. K., Wray, E. M., Hodges, L., Sessions, A. E., Wang, E., Merrill, A. H., Jr. y Riley, R. T. Fumonisin-and AAL-Toxin-Induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.* 1994, 106:1085-1093.
3. Agrios, G. N. PLANT PATHOLOGY. 4ª Edición. Academic Press. USA. 1997.
4. Baizabal-Aguirre, V. M. y González de la Vara, L. E. Characterization of the protein kinase in beet root plasma membranes. *Physiol. Plant.* 1994, 91:147-154.
5. Baizabal-Aguirre, V. M. y González de la Vara, L. E. Purification and characterization of a calcium-regulated protein kinase from beet root (*Beta vulgaris*) plasma membranes. *Physiol. Plant.* 1997, 99:135-143.
6. Ballio, A. Non-host-selective fungal phytotoxins: Biochemical aspects of their mode of action. *Experientia* 1991, 47:783-790.
7. Bernal Lugo, I. y Loza Talevera, H. AVANCES EN BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS. Facultad de Química, UNAM, 2002.
8. Blumwald, Eduardo., Aharon, Gilard S. y Lam, Bernard C-H. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 1998, 3:342-346.
9. Bollag, D. M., Rozycki, M. D. y Edelstein, S. J. PROTEIN METHODS. 2ª Edición. Wiley-Liss, USA, 1996.
10. De Nisi, P., Dell'Orto, M., Pirovano, L. y Zocchi, G. Calcium-dependent phosphorylation regulates the plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity of maize (*Zea mays* L.) roots. *Planta* 1999, 209:187-194.
11. Desjardins, A. E. y Hohn, T. M. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Mol. Plant - Microbe Interactions* 1997, 10:147-152.
12. Dixon, R. A. y Lamb, C. J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Plant Physiol.* 1990, 41:339-367.

13. Doehlert, D. C., Knutson, C. A. y Vesonder, R. F. Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia* 1994. 127:117-121.
14. Dunbar, B. S. TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS AND IMMUNOLOGICAL TECHNIQUES. Plenum Press. USA. 1987.
15. Durbin, R. D. Bacterial phytotoxins: mechanisms of action. *Experientia* 1991. 47:776-783.
16. Fan, L., Coursol, S., Le Stunff, H., Spiegel, S., Gilroy, S., Assmann, S. M. Regulation of ion channel activity by sphingosine-1-phosphate in Arabidopsis guard cells. Poster: Membrane Transport 2002.
17. Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vlegaar, R. y Kreik, N. P. J. Fumonins-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. 54:1806-1811.
18. Graniti, A. Phytotoxins and their involvement in plant diseases. *Experientia* 1991. 47:751-755.
19. Gutiérrez, N. N. A. Tesis de Doctorado. Programa en Ciencias Bioquímicas. Interacción de la Fumonisina B<sub>1</sub> con la membrana plasmática: efectos en la Bicapa lipídica y en la actividad enzimática. UNAM 2003.
20. Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 1996. 8:1773-1791.
21. Hirkman, W. J. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 1986. 81:802-806.
22. Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J. y Sandhoff, K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 2000. 1485:63-99.
23. Knogge, W. Fungal Infection of plants. *Plant Cell* 1996. 8:1711-1722.
24. Knogge, W. Fungal pathogenicity. *Plant - Microbe Interactions*. 1998. 1:324-328.
25. Matsudaira, P.T. y Burgess, D.R. SDS Microslab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1978. 87:386-396.
26. Megidish, T., Takio, K., Titani, K., Iwabuchi, K., Hamaguchi, A., Igarashi, Y. y Hakomori, S. Endogenous substrates of sphingosine-dependent kinases (SDKs) are chaperone proteins: heat shock proteins, glucose-regulated proteins, protein disulfide

- isomerase, and calreticulin. *Biochemistry*. 1999, 38:3369-3378.
27. Nelson, D. L., y Cox, M. M. LEHNINGER PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY. 3<sup>a</sup> Edition. Worth Publishers. USA, 2000.
28. Nelson, P.E., Toussoun T. A., y Marasas. FUSARIUM SPECIES IDENTIFICATION AND MICOTOXICOLOGY. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. 1984.
29. Nelson, P. E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 1992, 117:29-36.
30. Nelson, P. E. Fumonisin. Mycotoxins Produced by *Fusarium* Species: Biology, Chemistry, and Significance. *Phytopathology*. 1993, 31:233-252.
31. Ng, C. K.-Y., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B. y Hetherington, A. M. Drought-induced guard cell signal transduction involves Sphingosine-1-phosphate. *Nature* 2001, 410:596-599.
32. Oecking, C., Piotrowski, M., Hagemeyer, J. y Hagemann, K. Topology and target interaction of the fusicoccin-binding 14-3-3 homologs of *Commelina communis*. *Plant J*. 1997, 12(2):441-453.
33. Oishi, K., Zheng, B. y Kuo, J. F. Inhibition of Na,K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, bisphosphatidylcholine, and oleic acid. *J. Biol. Chem.* 1990, 265:70-75.
34. Packer, L. y Douce, R. METHODS IN ENZYMOLOGY. Vol. 148 Plant Cell Membranes. Academic Press Inc. USA, 1987.
35. Peterson, G. L. *Anal. Biochem.* 1977, 83:346-356.
36. Ranjeva, R. y Boudet, A. M. Phosphorylation of proteins in plants: regulatory effects and potential involvement in stimulus/response coupling. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 1987, 38:73-93.
37. Raya, J. C. y González de la Vara, L. E. Purification and characterization of a probable light receptor with kinase activity from beet root plasma membranes. *Planta* 2001, 213:802-810.
38. Riley, R. T., Wang, E. y Merrill, A. H., Jr. Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine-to-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. *J. AOAC Int.* 1994, 77:533-540.

39. Roberts, M. R. y Bowles, D. J. Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiol.* 1999, 119:1243-1250.
40. Romeis, T. Protein kinases in the plant defence response. *Curr. Op. Plant Biol.* 2001, 4:407-414.
41. Rosenberg, I. M. PROTEIN ANALYSIS AND PURIFICATION BENCHTOP TECHNIQUES. Birkhäuser, USA, 1996.
42. Santana, C., Segura, D. y Sánchez, S. Síntesis, función y origen evolutivo de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos. *Microbiology*, 1994, 36:139-158.
43. Schägger, H. y Von Jagow, G. Tricine – sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1987, 166:368-379.
44. Schaller, A. y Oecking, C. Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* 1999, 11:263-272.
45. Scheell, D. Resistance response physiology and signal transduction. *Plant Biol.* 1998, 1:305-310.
46. Simon-Plas, F., Gomès, E., Milat, M-L., Pugin, A. y Blein, J-P. Cercospora beticola toxins. X. Inhibition of plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase by beticolin-1. *Plant Physiol.* 1996, 111:773-779.
47. Somssich, I. E. y Hahlbrock, K. Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 1998, 3:86-90.
48. Suzuki, Y. S., Wang, Y., Takemoto, J. Y. Syringomycin-stimulated phosphorylation of the plasma membrane H<sup>+</sup> - ATPase from red beet storage tissue. *Plant Physiol.* 1992, 99:1314-1320.
49. Vera-Estrella, R., Higgins, V. J. y Blumwald, E. Plant defense response to fungal pathogens. I. Activation of host-plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol.* 1994, 104:209-215.
50. Vera-Estrella, R., Higgins, V. J. y Blumwald, E. Plant defense response to fungal pathogens. II. G-Protein-mediated changes in host plasma membrane redox reactions. *Plant. Physiol.* 1994, 106:97-102.
51. Von Jagow, G. y Schägger, H. A PRACTICAL GUIDE TO MEMBRANE PROTEIN PURIFICATION. Academic Press, Inc. USA, 1994.

52. Wray, W., Bouliskas, T., Wray, V. P. y Hancock, R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1981. 118:197-203.
53. Xing, T., Higgins, V. J. y Blumwald, E. Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane  $H^+$ -ATPase. *Plant Cell* 1996. 8:555-564.
54. Yoo, H-S., Norred, W. P., Showker, J. y Riley, R. T. Elevated sphingoid bases and complex sphingolipid depletion as contributing Factors in fumonisin-induced cytotoxicity. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 1996. 138:211-218.
55. Zomosa, S. V. Ch. Tesis de licenciatura. Determinación de los patrones de fosforilación de proteínas de membrana plasmática en embriones de maíz expuestos a la Fumonisina B<sub>1</sub>. UNAM, 2000 pp. 93.