



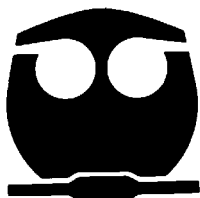
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
DE MEMBRANAS RESISTENTES A
DETERGENTE (DRM) EN DIFERENTES
ESPECIES VEGETALES.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
CARMONA SALAZAR LAURA



MÉXICO, D.F.

Febrero de 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Dra. Marietta Tuena Sangri
Vocal: Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
Secretario: Dr. Omar H. Pantoja Ayala
Suplente: Dra. Irma Bernal Lugo
Suplente: Dr. Salvador Uribe Carvajal

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

Asesor del Tema: _____
Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Sustentante: _____
QFB. Laura Carmona Salazar

Comité tutorial: Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez (IFC, UNAM)
Dr. Luis Eugenio González de la Vara (CINVESTAV, Irapuato.)

RECONOCIMIENTOS

Laura Carmona Salazar, recibió becas de CONACYT (No. 183583) y de UC-MEXUS, Universidad de California.

El trabajo de tesis fue financiado por los proyectos CONACYT (40311-Q) y UC-MEXUS, Universidad de California (CN-03-118).

A la colaboración de la Pas. Q. en A. Liliana Loyola y del Pas. Q. en A. Christian A. Vázquez Vázquez.

A la ayuda técnica de la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo y de la Q. Laurel Fabila Ibarra.

A los especialistas Jorge Sepúlveda y Rodolfo Paredes, por su participación en el trabajo de microscopía electrónica de transmisión realizada en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular.

Al Dr. Luis E. González de la Vara del CINVESTAV Irapuato, por haber proporcionado el anticuerpo contra la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

Al jurado asignado, por la revisión y las sugerencias realizadas al presente trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN *11-12*

INTRODUCCIÓN *13-42*

I. Membranas biológicas *13-14*

Funciones generales de las membranas biológicas *13-14*

A) Delimitación del volumen celular *13*

B) Transporte de solutos *13*

C) Transducción de energía *13-14*

D) Comunicación celular con el ambiente y con otras células *14*

II. La membrana plasmática *14-17*

A) Estructura *14*

B) Composición *14*

C) Asimetría *14*

D) Mesomorfismo liotrópico *14-15*

E) Movilidad lipídica *15-16*

a) Movilidad lateral *15*

b) Movilidad rotacional *16*

c) Movimiento de bamboleo *16*

d) Movilidad transmembranal o flip-flop *16*

e) Intercambio monomérico *16*

F) Carga de superficie *16-17*

G) Permeabilidad selectiva *17*

III. Componentes de las membranas plasmáticas de plantas *17-32*

A) Lípidos *17-26*

a) Glicerolípidos *17-18*

b) Esfingolípidos y glicoesfingolípidos *19-24*

c) Esteroles *24-26*

B) Proteínas *27-32*

a) Clasificación de las proteínas membranales *27-28*

i) Las proteínas periféricas o extrínsecas *27*

ii) Las proteínas integrales, transmembranales o intrínsecas *27-28*

b) Estructura de las proteínas de membrana *28*

c) Características de las proteínas membranales *28-29*

d)	Propiedades de las proteínas membranales	30-31
i)	Movilidad	30
ii)	Interacción proteína-lípido	30-31
e)	Tipos de proteínas de la membrana plasmática de plantas	31-32
IV.	Estructura de las membranas biológicas	32-42
A)	Técnicas de estudio de las membranas	32-35
a)	Técnicas con fluorescencia	33-34
i)	Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP)	33
ii)	Transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET)	33-34
b)	Entrecruzamiento químico	34
c)	Seguimiento de partícula sencilla	34
d)	Microscopia de fuerza fotónica	34-35
B)	Modelo membranal actual	35-42
a)	Caveolas	35
b)	Red de actina asociada a la membrana	35 36
c)	Balsas lipídicas	37-42
i)	Diferentes denominaciones de las balsas lipídicas	37
ii)	Métodos de estudio de las balsas lipídicas	37-38
iii)	Detección de las balsas lipídicas en diferentes tipos celulares	38
iv)	Modelo estructural propuesto para las balsas lipídicas	38-39
	<i>Lípidos de las balsas lipídicas</i>	38-39
	<i>Proteínas de las balsas lipídicas</i>	39
v)	Funciones generales de las balsas lipídicas	39-42
	<i>Las balsas lipídicas en la transducción de señales</i>	39-41
	<i>Balsas lipídicas y patogénesis</i>	41-42
	ANTECEDENTES GENERALES	43
	ANTECEDENTES INMEDIATOS	43-44
	HIPÓTESIS	45
	OBJETIVO GENERAL	46
	OBJETIVOS PARTICULARES	46
	MATERIALES Y MÉTODOS	47-63
I.	Material biológico	47-49
A)	Germinación de los embriones de semillas de <i>Zea mays</i> (raza criolla Chalqueño)	

- B) Obtención de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Canario 60 47-49
 - C) Obtención de plantas de *Nicotiana tabacum* línea T11 49
 - D) Recolección de las hojas de los dos tejidos vegetales fotosintéticos 49
 - II. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática (VMP) de los diferentes tejidos vegetales 50-54
 - A) Obtención de la fracción microsomal de los embriones de semillas de *Zea mays* (raza criolla Chalqueño) 50, 51
 - B) Obtención de la fracción microsomal de hojas de *P. vulgaris* y de *N. tabacum* 50, 52
 - C) Obtención de VMP de los diferentes tejidos vegetales 53-54
 - III. Determinación de proteína 54
 - IV. Obtención de membranas resistentes a la solubilización por detergente (DRM) a partir de VMP 54-55
 - V. Microscopia electrónica 56
 - VI. Determinación de hidrólisis de ATP 56-58
 - VII. Determinación de la actividad de la Glucan sintasa II 58
 - VIII. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS 58-61
 - IX. Inmunoréplica contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática 61-62
 - X. Análisis de BCL y de ceramidas por cromatografía en capa fina (TLC) 62-63
- RESULTADOS 64-82

- I. Purificación de VMP de embriones de *Zea mays*, hojas de *Phaseolus vulgaris* y *Nicotiana tabacum* 64-68
 - A) Determinación de la actividad de enzimas marcadoras 64-66
 - B) Detección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por inmunoréplica 67
 - C) Ultraestructura de las fracciones membranales 67-71
- II. Obtención de membranas resistentes a la solubilización con detergente Tritón X-100 (DRMs) a partir de VMP de embriones de *Zea mays*, hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* 68, 72-78
 - A) Ultraestructura de las fracciones de DRMs 72-74
 - B) Detección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en inmunoréplica en VMP y DRMs obtenidos de las tres especies vegetales 74-75
 - C) Perfil lipídico VMP y de DRMs obtenidos de las tres especies vegetales 75-78

a) Detección de bases de cadena larga (BCL) en los extractos lipídicos de VMP y DRM 76

b) Detección de ceramidas libres en los extractos lipídicos de las diferentes especies estudiadas 76-78

III. DRMs de tejidos sensibles a la Fumonisina B₁ 78-82

A) Detección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en VMP y DRMs obtenidos de embriones de *Zea mays* expuestos a la FB₁ 79-80

B) Análisis ultraestructural de las fracciones de DRMs obtenidas en las dos especies vegetales sensibles a la FB₁ 80-82

DISCUSIÓN 83-95

I. El aislamiento de VMP como fracción subcelular para purificar DRM 84-87

II. El aislamiento de DRM de una especie monocotiledónea y dos dicotiledóneas 87-92

III. El efecto de la FB₁ en los DRM 92-95

CONCLUSIONES 96

PERSPECTIVAS 97

APÉNDICE 98-110

I. Ácidos grasos 98

II. Fumonisina B₁ 99-102

III. Tabla de proteínas de la membrana plasmática que han sido identificadas experimentalmente en diferentes especies vegetales y se muestran clasificadas de acuerdo a su función 103-110

ABREVIATURAS 111-113

BIBLIOGRAFÍA 114-123

ÍNDICE DE TABLAS

- I. Composición de glicerolípidos de la membrana plasmática de diferentes especies vegetales
- II. Composición de esteroides de membranas celulares en diversas especies vegetales
- III. Soluciones utilizadas en la obtención de fracciones subcelulares de los embriones de *Zea mays* y de los tejidos vegetales fotosintéticos (*Nicotiana tabacum* o *Phaseolus vulgaris*)
- IV. Composición de las soluciones empleadas para preparar la mezcla de fases
- V. Composición de los geles de poliacrilamida-SDS (Schägger y Von Jagow, 1987)
- VI. Purificación de VMP de tres tejidos vegetales
- VII. Recuperación de las diferentes fracciones membranales obtenidas de embriones de *Zea mays*, de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*
- VIII. Recuperación de las diferentes fracciones membranales obtenidas de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* expuestas \pm FB₁
- IX. Efecto de la FB₁ en plantas.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura de los principales ácidos grasos y grupos polares de glicerolípidos de las membranas celulares de plantas (modificada de Ohlrogge y Browse, 1995).
- Figura 2. Estructura básica de los esfingolípidos complejos.
- Figura 3. Estructuras de bases de cadena larga comunes de plantas.
- Figura 4. Pasos enzimáticos de la síntesis *de novo* de esfingolípidos demostrada en plantas.
- Figura 5. Estructura de diferentes tipos de esteroides presentes en plantas.
- Figura 6. Modelo de “barda de citoesqueleto”.
- Figura 7. Modelo estructural propuesto para las balsas lipídicas.
- Figura 8. Procedimiento de obtención de la fracción microsomal de embriones de *Zea mays*.
- Figura 9. Procedimiento de obtención de la fracción microsomal de hojas de *P. vulgaris* y de *N. tabacum*.
- Figura 10. Diagrama que ilustra el procedimiento de purificación de las VMP a partir de diferentes tejidos vegetales.
- Figura 11. procedimiento de obtención de membranas resistentes a la solubilización por detergente (DRM).
- Figura 12. Purificación de VMP de tres tejidos vegetales diferentes.
- Figura 13. Determinación de la ATPasa de H⁺ en las fracciones de FM y de VMP.
- Figura 14. Micrografías electrónicas de diferentes fracciones membranales de embriones de *Zea mays*.
- Figura 15. Micrografías electrónicas de diferentes fracciones membranales de hojas de *Phaseolus vulgaris*.
- Figura 16. Micrografías electrónicas de diferentes fracciones membranales de hojas de *Nicotiana tabacum*.
- Figura 17. Micrografías electrónicas de transmisión de DRMs obtenidos a partir de fracción microsomal de hojas de *Nicotiana tabacum* y de *Phaseolus vulgaris*.
- Figura 18. Micrografías electrónicas de transmisión de DRMs obtenidos a partir de VMP de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris*.
- Figura 19. Detección de la ATPasa de H⁺ en las fracciones de VMP y de DRM

- Figura 20. Determinación de bases de cadena larga (BCL) en las VMP y en fracciones de DRM de embriones de *Zea mays* y hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*.
- Figura 21. Determinación de ceramidas en las VMP y en fracciones de DRM de embriones de *Zea mays* y hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* por TLC.
- Figura 22. Determinación de ceramidas en las VMP y en fracciones de DRM de embriones de *Zea mays* y hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*.
- Figura 23. Estimación de la ATPasa de H⁺ en las diferentes fracciones membranales obtenidas de los embriones de *Zea mays*.
- Figura 24. Micrografías electrónicas de transmisión de DRMs obtenidos a partir de VMP de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* expuestos a la FB₁.
- Figura 25.- Efecto de la FB₁ sobre las balsas lipídicas de embriones de *Zea mays*.

RESUMEN

La membrana plasmática es de gran importancia para la célula, debido a que percibe, transmite y da respuesta al entorno celular, integrando y reclutando para ello los diversos elementos que la conforman. Estas funciones han sido destacadas en las últimas dos décadas bajo la nueva percepción de la estructura membranal que concibe la presencia de balsas lipídicas. El modelo establece la presencia de dominios dinámicos en la membrana que se encuentran enriquecidos en esteroides y esfingolípidos.

Se ha demostrado la presencia de balsas lipídicas en diferentes tipos celulares de eucariontes y su existencia se ha asociado al aislamiento de fracciones membranales resistentes a la solubilización por detergentes no-iónicos (DRM). En plantas, recientemente tres grupos de investigación han aislado fracciones de DRM de la membrana plasmática de hojas de *Nicotiana tabacum* (Peskan *et al.*, 2000; Mongrand *et al.*, 2004) y de cotiledones y de callo de *Arabidopsis thaliana* (Shaollari *et al.*, 2005; Borner *et al.*, 2005). Estos trabajos han demostrado que los DRM tienen una composición diferente de proteínas y lípidos a la del resto de la membrana plasmática. En esta tesis, se diseñó un protocolo para aislar DRM a partir de otros existentes en la literatura y que reduce de 16 a 18 h los procedimientos reportados, aislando DRM con características semejantes a los de preparaciones análogas de plantas, levaduras y mamíferos. Se ha encontrado que existen fracciones de DRM similares en la membrana plasmática de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris*. Se obtuvieron también de *Nicotiana tabacum* con el fin de compararlas y se ha obtenido un rendimiento similar en las tres especies, mismo que coincide con los reportes de otras especies de plantas (Mongrand *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005). Los DRMs mostraron un enriquecimiento de la ATPasa de H⁺ con respecto a la preparación de la membrana plasmática de la que se originaron. La microscopía electrónica de transmisión de las fracciones de DRM obtenidas reveló la presencia de estructuras de apariencia semejante a la de DRM de células de mamíferos (Braccia *et al.*, 2003), de plantas (Mongrand *et al.*, 2004) y de levadura (Idkowiak-Baldys *et al.*, 2004). Finalmente, el análisis por cromatografía en capa fina reveló un patrón de lípidos diferente entre las fracciones DRM y las membranas plasmáticas de donde fueron aisladas.

Ya que el aislamiento de DRM ha sido usado como una evidencia a favor de la existencia de balsas lipídicas, en el presente trabajo se exploró la existencia de estas estructuras en la membrana plasmática de dos especies vegetales no estudiadas en la literatura, a través de la modificación de los niveles endógenos de esfingolípidos empleando a la Fumonisina B₁ (FB₁) y

evaluando su impacto en la formación de DRM. Se demostró que el desbalance en lípidos esfingoideos generado por la adición de la FB₁ promovió cambios en la ultraestructura de DRMs obtenidas de *Zea mays* y *Phaseolus vulgaris*, lo cual sugiere que éstas son estructuras enriquecidas en esfingolípidos y que los niveles celulares de esfingolípidos pueden modificar la estructura de DRMs. Este criterio apoya la identidad de las DRM en nuestra preparación.

Este trabajo constituye el primer reporte de aislamiento de DRM de una monocotiledónea y con ello, la posibilidad de la existencia de balsas lipídicas en las membranas plasmáticas de todas las células vegetales.

INTRODUCCIÓN

I. MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Todas las membranas biológicas tienen una estructura común: una bicapa lipídica y proteínas y carbohidratos asociados a ésta, la mayoría de los cuales llevan a cabo funciones específicas de reconocimiento, transporte o señalización (Singer, 2004). El ensamblaje lipídico de la membrana es, en un sentido, complejo que el de otros constituyentes biológicos y aún cuando sus unidades no están covalentemente conectadas, mantienen una gran cohesividad, en un arreglo que resulta ser altamente dinámico y estable (Binder *et al.*, 2003).

Las membranas plasmáticas confieren individualidad a las células separándolas de su entorno, sin embargo no son simples paredes, sino que constituyen barreras de permeabilidad muy selectivas y que contienen una gran variedad de moléculas que le proporciona otras funciones a través de mecanismos muy sofisticados (Edidin, 2003). Las membranas de las células eucarióticas delimitan organelos: mitocondrias, cloroplastos, lisosomas, etc. La especialización funcional de las células durante el curso de la evolución ha estado estrechamente unida a la formación de estos compartimentos.

Funciones generales de las membranas biológicas

La organización general y funcional del sistema endomembranal esta altamente conservada en las células eucarióticas. Dentro de las principales funciones de las membranas biológicas encontramos:

- A) Delimitación del volumen celular.- Las membranas le confieren a las células su individualidad al separarlas de su entorno. A su vez, el sistema endomembranal permite la compartimentalización celular (Singer, 2004).
- B) Transporte de solutos.- Las proteínas membranales integrales desempeñan papeles cruciales en procesos de transporte de solutos, ya que algunas tienen la función de transportar específicamente ciertas moléculas del exterior celular hacia su interior o bien del citoplasma hacia el lumen del organelo o viceversa, de tal modo que pueden sensar y regular la composición de ciertos solutos del entorno celular u organelar.
- C) Transducción de energía.- Varios tipos de membranas como las plasmáticas de procariontes y las de mitocondria y cloroplastos en eucariontes están especializadas en la conversión de diferentes formas de energía como química, luminosa y osmótica. Para ello están dotadas de un

gran número de proteínas, generalmente asociadas en complejos de 3 a 40 subunidades que son capaces de actuar secuencialmente en reacciones que involucran el transporte de H^+ y la síntesis o hidrólisis de ATP.

D) Comunicación celular con el ambiente y con otras células.- Las células representan un complejo de lípidos y proteínas combinado con muchos otros componentes. Se ha demostrado que el crecimiento y el desarrollo de una planta depende de la interacción entre estos factores y su medio externo. Actualmente, está ampliamente aceptado que la membrana plasmática representa un indicador sensible de los cambios del medio y es muy probable que la respuesta de la planta ante su medio sea regulada a nivel de la membrana plasmática (Cowan *et al.*, 1993; Mas *et al.*, 1994; Olsson *et al.*, 1994). En ese sentido, se ha demostrado que la composición lipídica de la membrana plasmática de diferentes tejidos vegetales influencia un número de factores cruciales para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Éstos incluyen la modulación de la actividad de la ATPasa de H^+ (Grandmougin *et al.*, 1989; Cowan *et al.*, 1993), efectos sobre la fluidez y permeabilidad (Cowan *et al.*, 1993; Bohn *et al.*, 2001) y la aclimatación a la temperatura (Clarkson *et al.*, 1980; Lynch y Steponkus, 1987; Cowan *et al.*, 1993).

II. LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Las características y propiedades de las membranas plasmáticas son comunes a los de todas las membranas biológicas:

A) Presentan una estructura laminar, continua, que está formada por dos monocapas contrapuestas entre sí y que se mantienen unidas por interacciones hidrofóbicas.

B) Están constituidas por lípidos, proteínas y carbohidratos. Estos últimos se encuentran unidos a lípidos y proteínas. Las uniones químicas lípido-lípido y lípido-proteína son a través de interacciones no covalentes; principalmente del tipo hidrofóbico, electrostático o de puentes de hidrógeno. Sin embargo, el gran número de estas uniones débiles produce una bicapa con estructura muy estable.

C) Otra propiedad de las membranas es su composición asimétrica en los dos lados o caras de la bicapa. En el caso de la membrana plasmática se ha encontrado que en la cara externa predominan los esfingolípidos y la fosfatidilcolina, mientras que otros glicerofosfolípidos como el fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina son más abundantes en la cara interna (Bohn *et al.*, 2001; Munro, 2003).

D) Mesomorfismo liotrópico. Como se mencionó anteriormente, la bicapa membranal es una estructura supramolecular mantenida fundamentalmente por interacciones hidrofóbicas. Estas

interacciones no son lo suficientemente fuertes para inmovilizar las moléculas que se encuentran en su estructura; por consiguiente la bicapa se comporta como un líquido a temperaturas fisiológicas, mientras que al mismo tiempo puede tener un orden regular casi cristalino en su estructura. Este estado cristal-líquido no es manifestado por todas las moléculas en la naturaleza. Las moléculas que pueden formar cristales líquidos son generalmente elongadas en su forma y de elevado peso molecular. Los cristales-líquidos son ópticamente anisotrópicos (transmiten ondas de luz a diferentes velocidades en varias direcciones). El estado cristal-líquido se clasifica en dos tipos: el termotrópico y el liotrópico. El estado termotrópico implica un solo componente en el sistema, mientras que el estado liotrópico involucra más de un componente. Las membranas biológicas presentan un estado liotrópico, ya que son consideradas sistemas de dos componentes (molécula anfipática-agua) y donde la parte anfipática que es el lípido, puede presentar cambios de fases, ya sea ordenadas o desordenadas y con diferentes arreglos (micelar, cúbica, hexagonal o lamelar) (Datta, 1987).

Por su mesomorfismo liotrópico, las bicapas lipídicas pueden presentar diversos estados físicos, los cuales difieren en el empaquetamiento, el grado de orden y la movilidad de los lípidos. Las dos fases extremas son la fase de gel y la fase líquida desordenada (l_d), las bicapas en la fase l_d son altamente fluidas y sus lípidos presentan una elevada movilidad rotacional y lateral. En contraste, en la fase de gel sólido, los lípidos están altamente ordenados, empaquetados densamente y por lo tanto su movilidad en el plano de la bicapa se reduce fuertemente; sin embargo, en presencia del colesterol, las bicapas lipídicas pueden adoptar una tercera fase intermedia, denominada fase líquida-ordenada (l_o); la presencia del colesterol en la membrana incrementa el orden de las cadenas hidrocarbonadas, pero más importante, reduce la formación de fases de gel (van der Goot y Harder, 2001). Se ha encontrado que el colesterol interactúa estructuralmente más con los esfingolípidos que con los fosfoglicerolípidos insaturados (Munro, 2003). Dado el nivel elevado de esteroides en la membrana plasmática es importante considerar cómo afecta el colesterol las propiedades físicas de la bicapa lipídica de células animales (van der Goot y Harder, 2001).

E) Movilidad lipídica.

a) Movilidad lateral.- Los lípidos se mueven en el plano lateral de la membrana con coeficientes de difusión que son entre 10-100 veces mayores a los de la mayoría de las proteínas membranales, y pueden llegar a recorrer un área entre $0.1-1 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ en una célula que típicamente tiene una dimensión entre 10-20 μm de diámetro.

b) Movilidad rotacional.- Es el movimiento en el cual una molécula de lípido gira alrededor de su propio eje longitudinal.

c) Movimiento de bamboleo.- Es el movimiento en el cual la molécula lipídica se flexiona parcialmente hacia el centro de la bicapa y se mueve de regreso a su posición original sin cambiar su orientación longitudinal.

d) Movilidad transmembranal o flip-flop.- Es el movimiento de lípidos de una a otra monocapa de la membrana. En membranas modelo, el flip-flop espontáneo es lento para lípidos que tienen en su estructura un grupo polar y es más rápido para aquellos lípidos que carecen de este grupo. Los tiempos de vida media tienen un rango de segundos o minutos para el diacilglicerol (DAG), ceramida y colesterol y de horas o días para fosfatidilcolina (PC), esfingomielina y glicoesfingolípidos. Se ha encontrado que este tipo de movimiento es realizado de manera más rápida por flipasas, las cuales son proteínas o complejos de proteínas que facilitan un movimiento energéticamente no favorable del lípido a través del interior hidrofóbico de una membrana.

e) Intercambio monomérico.- Se refiere a que los lípidos pueden intercambiarse como moléculas sencillas entre diferentes membranas. Este intercambio implica la salida del lípido de la membrana hacia una fase acuosa y su inserción en otra membrana. Este tipo de movimiento es importante como un mecanismo de transporte entre los diferentes organelos (Holthuis y Levine, 2005).

F) Carga de superficie. Esta propiedad está determinada por la parte polar de lípidos, proteínas y carbohidratos de los que está constituida la membrana. Debido a que cada tipo de membrana presenta una composición específica de estos tres tipos de moléculas, se puede inferir que cada membrana presenta una carga de superficie particular. Por otro lado, la mayoría de las membranas están polarizadas eléctricamente, con carga negativa en el interior (normalmente negativa, de -120 a -200 mV) (Sze *et al.*, 1999; Sondergaard *et al.*, 2004). La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática es una enzima que bombea protones al exterior celular formando un gradiente electroquímico de protones de lado a lado de la membrana plasmática e impulsa los diferentes sistemas de transporte acoplados a H^+ (antiporte y simporte) y el mecanismo de transporte (uniporte) acoplado al potencial de membrana para la entrada y salida de solutos. Además, el potencial de membrana regula muchos canales de iones integrados a la membrana plasmática (Shaller y Oecking, 1999; Sze *et al.*, 1999; Palmgren, 2001; Sondergaard *et al.*, 2004).

G) Permeabilidad selectiva. Las membranas plasmáticas presentan una permeabilidad muy selectiva, siendo muy baja para los iones y la mayoría de las moléculas polares. La impermeabilidad a los solutos polares es intrínseca de la naturaleza lipídica de la bicapa, pero las membranas contienen compuertas moleculares proteicas muy específicas, las cuales regulan la composición iónica y molecular del medio interno y que pueden ser bombas, canales o translocadores y que son responsables del transporte transmembranal pasivo o activo de solutos (Singer, 2004).

III. COMPONENTES DE LAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE PLANTAS

A) Lípidos

Los lípidos son constituyentes esenciales de todas las células vegetales, llegando a contener aproximadamente del 5 al 10% de lípido del peso seco total de la membrana. Los lípidos son una clase de compuestos extremadamente diversa en estructura y constituyen los productos de varias vías biosintéticas. Sin embargo, en la mayoría de las células, los tipos más abundantes de lípidos son los que se derivan de las vías biosintéticas de los ácidos grasos, los fosfoglicerolípidos y los esfingolípidos. Otras clases de lípidos incluyen compuestos derivados de la vía del isopreno, como los esteroides, giberelinas, ácido abscísico y la cadena lateral del fitol de la clorofila (Ohlrogge y Browse, 1995).

La membrana plasmática presenta una composición que es muy diferente a la de otras membranas de la célula, siendo los glicerolípidos, los esfingolípidos y los esteroides los lípidos que la componen.

a) Glicerolípidos

En las membranas de plantas, se encuentran dos grupos distintos de glicerolípidos que presentan una estructura común constituida por un esqueleto de glicerol con dos cadenas de ácidos grasos (ver Apéndice I). Los fosfoglicerolípidos ('fosfolípidos'), contienen fosfato en su grupo polar, y los glicoglicerolípidos ('glicolípidos') presentan una parte de carbohidratos (Dörmann, 2005).

Los diferentes tipos de ácidos grasos y de grupos polares que se presentan en los glicerolípidos pueden observarse en la Figura 1. Debido a las diferentes especificidades de sustrato de las enzimas implicadas en la acilación del esqueleto de glicerol ('aciltransferasas') (Dörmann, 2005), en las plantas superiores se presentan dos vías distintas para la síntesis de glicerolípidos (Ohlrogge y Browse, 1995): la vía procariótica que presenta exclusivamente los ácidos grasos C_{16} en la posición *sn-2*, C_{18} y pequeñas cantidades de C_{16} en la posición *sn-1*

(Dörmann, 2005) y en la que participa la envoltura interna del cloroplasto (Ohlrogge y Browse, 1995; Dörmann, 2005), y la vía eucariótica en la cual predominan los ácidos grasos C₁₈ en ambas posiciones-*sn*, y en menor cantidad C₁₆ en la posición *sn-1* (Dörmann, 2005) y que comienza con la síntesis de ácido fosfatídico en el retículo endoplásmico (ER) (Ohlrogge y Browse, 1995, Dörmann, 2005).

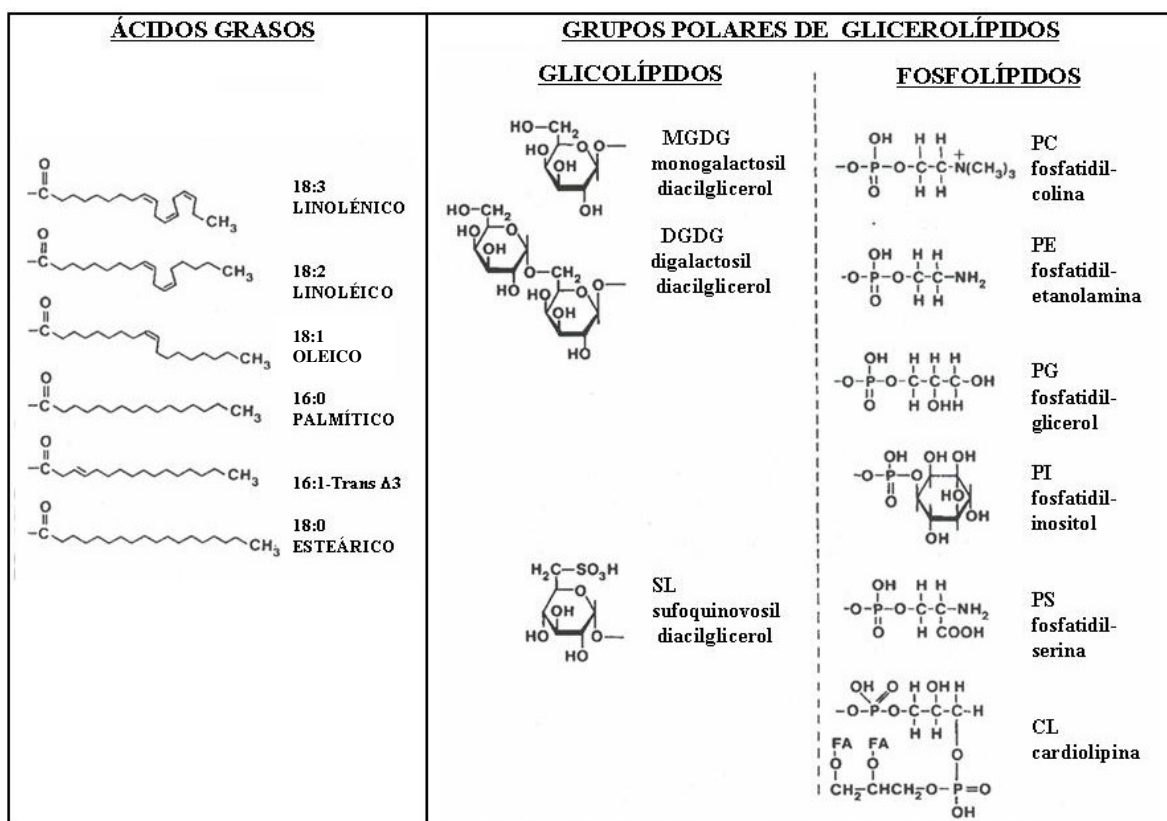


Figura 1. Estructura de los principales ácidos grasos y grupos polares de glicerolípidos de las membranas celulares de plantas (modificada de Ohlrogge y Browse, 1995).

Los primeros pasos de la síntesis de los fosfolípidos son dos reacciones de acilación, en las que se transfieren ácidos grasos al glicerol-3-fosfato para dar lugar a la formación del ácido fosfatídico. En todos los tejidos de la planta, los principales fosfolípidos son primeramente sintetizados utilizando solamente grupos acilo 16:0 y 18:1. La subsecuente desaturación de los lípidos hacia sus formas altamente insaturadas es catalizada por desaturasas que se encuentran unidas a la membrana del cloroplasto y del retículo endoplasmático (Ohlrogge y Browse, 1995). La Tabla I muestra la composición de glicerolípidos de la membrana plasmática en diferentes especies vegetales.

b) Esfingolípidos y glicoesfingolípidos

El término de “esfingosina” fue acuñado por J. L. W. Thudichum en 1884, por las propiedades enigmáticas (“esfinge”) de estos compuestos. Hasta finales de 1970 los lípidos fueron considerados únicamente como componentes estructurales inertes de las membranas celulares. Sin embargo, a la fecha se ha ido acumulando evidencia del papel importante de los lípidos en el señalamiento celular (Merrill *et al.*, 1997; Huwiler *et al.*, 2000).

La estructura básica de los esfingolípidos se ilustra en la Figura 2, la cual está constituida por una base de cadena larga (BCL), que es un alcohol aminado de cadena hidrocarbonada larga (2-amino-1,3-hidroxicano), cuyo nombre común es esfinganina, y que puede estar saturada o insaturada (entre C₄ y C₅ o entre el C₈ y C₉), que presenta un ácido graso de 14 a 26 átomos de carbono y que se encuentra *N*-acilado al grupo amino de la BCL (Dunn *et al.*, 2004). Adicionalmente, cuando un grupo polar se esterifica en la posición C₁ de la BCL se forma un esfingolípidos complejo (Merrill *et al.*, 1997). Clásicamente, en los esfingolípidos de células animales, si el grupo polar es un carbohidrato, se llaman glucoesfingolípidos, los cuales se dividen en cerebrósidos (con un solo azúcar unido a la ceramida), globósidos (con dos o más azúcares) y gangliósidos (con oligosacáridos unidos) (Sperling y Heinz, 2003).

En plantas, los cerebrósidos presentan entre uno y cuatro residuos glicosídicos unidos al grupo hidroxilo primario de las diferentes BCL derivadas de la esfinganina, mientras que en las glucosil inositol fosforilceramidas (GIPC, fitoglicolípidos), su grupo típico inositol-1-fosfato se une al C-1 de la BCL a través de un enlace fosfodiéster, el cual a su vez puede ser extendido por cadenas de oligosacáridos. Ha sido demostrado que las GIPC en mamíferos, levadura, plantas y protozoarios, funcionan como anclas membranales anfipáticas (anclas de glucosil fosfatidil inositol o GPI) que unen covalentemente proteínas hidrofílicas (Sperling y Heinz, 2003).

Los tipos de esfingolípidos más abundantes en mamíferos son la esfingomielina y los gangliósidos que presentan como grupos cabeza polar a residuos de galactosa y ácido neuramínico (siálico), mientras que las GIPCs prevalecen en levadura (Dunn *et al.*, 2004; Sperling y Heinz, 2003). Los esfingolípidos predominantes en plantas son los cerebrósidos y GIPC, mientras que los globósidos no han sido detectados.

En cuanto a los esfingolípidos de plantas existe una diversidad estructural considerable con respecto a sus bases de cadena larga y sus ácidos grasos. Las bases de cadena larga se forman a partir de ocho bases diferentes de C₁₈ derivadas de *D*-eritro-esfinganina, siendo los isómeros de

4,8-esfingadienina, 4-hidroxi-8-esfinganina y 8-esfinganina las más abundantes. La Figura 3 muestra estas estructuras (Sperling y Heinz, 2003).

Tabla I. Composición de glicerolípidos de la membrana plasmática de diferentes especies vegetales.

ESPECIE VEGETAL	GLICEROLÍPIDOS	REFERENCIA
Semillas de <i>Secale cereale</i> L. cv. Puma	46.7% PC ¹ , 34.4% PE, 5.7% PG, 5.4% PA, 4.7% PS, 2.2% PI y 0.9% otros	Lynch y Steponkus, 1986
Raíz de <i>Zea mays</i>	39% PC, 35% PE, 14% PG, 9% PI+PS, 4% Liso-PC	Grandmougin <i>et al.</i> , 1989
	36% PC, 32.3% PE, 12.1% PG, 10.5% PI, 9.1% PS	Bohn <i>et al.</i> , 2001
Semillas y brotes de ramas de * <i>Picea abies</i> L. Karst	Semillas: 40%PC, 30% PE, 14% PG, 15% PI Árbol maduro: 58% PC, 28% PE, 8% PI, 2% PG	Olsson <i>et al.</i> , 1994
Hojas de <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Pinot Noir	30.3% PC, 17.6% PE	Mas <i>et al.</i> , 1994
Raíz de <i>Triticum aestivum</i> L.	39.1% PC, 35.4% PE+PG, 8.0% PI+PS, 7.8% PA	Zhang <i>et al.</i> , 1997
En gancho de hipocótilo de Semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Limburgse Vroege y hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Heynh (Ecotipo Columbia)	34% PA, 23% PC, 23% PE, 11% PS, 6% PI y trazas de PG	Bérczi y Horvath, 2003

* Composición de glicerolípidos en la fracción microsomal.

¹Ácido fosfatídico, PA; Fosfatidilcolina, PC; Fosfatidiletanolamina, PE; Fosfatidilglicerol, PG y Fosfatidilinositol, PI.

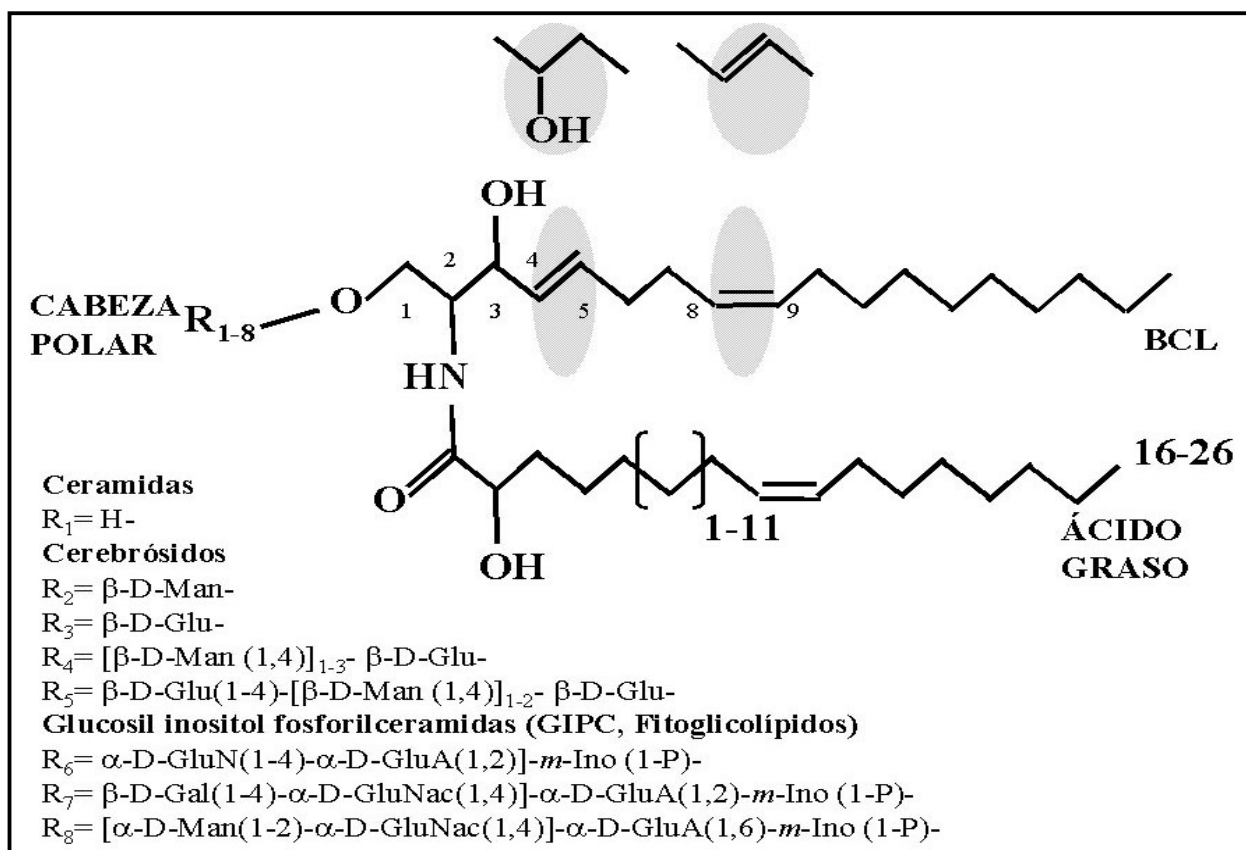


Figura 2. Estructura básica de los esfingolípidos complejos. Las regiones sombreadas indican las posibles modificaciones como hidroxilaciones o insaturaciones en configuración *cis* o *trans* así como la región entre paréntesis indica la elongación de la cadena del ácido graso (Tomada de Sperling y Heinz, 2003).

Los ácidos grasos α -hidroxilados constituyen aproximadamente el 90% de los ácidos grasos totales de los esfingolípidos de plantas, en donde las cadenas aciladas C_{16} a C_{24} saturadas son las que más se presentan (Lynch, 1999; Dunn *et al.*, 2004).

En hojas de *Phaseolus vulgaris* han sido identificados un fitoglicolípidos, ácidos grasos saturados con C_{22} , C_{24} y C_{26} , hidroxilados en la posición 2. Como bases de cadena larga se han detectado 53% de dehidrofitoesfingosina (*D-ribo*-1,3,4-trihidroxi-2-amino-8-*trans*-octadecano) y 32% de fitoesfingosina (*D-ribo*-1,3,4-trihidroxi-2-amino-octadecano), así como una ceramida y un cerebrósido (Carter y Koob, 1969).

El primer paso en la síntesis de esfingolípidos es la condensación de L-serina con palmitoil-CoA a través de la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT) para formar 3-cetoesfinganina, la cual es reducida a esfinganina por la enzima 3-cetoesfinganina reductasa en la membrana del retículo endoplasmático (Merrill *et al.*, 1997; Huwiler *et al.*, 2000; Lynch, 1999; van Meer y Lisman, 2002). Las bases esfingoides o bases de cadena larga (BCL) están presentes

en la célula en bajas concentraciones debido a que rápidamente son aciladas con ácidos grasos de cadena larga a través de la esfinganina-*N*-aciltransferasa (ceramida sintasa) (Merrill *et al.*, 1997; Huwiler *et al.*, 2000; Lynch, 1999) formando *N*-acil-esfinganina (dihidroceramida). La adición subsecuente en la cara citosólica del RE de un doble enlace entre la unión de los carbonos 4 y 5 del esqueleto de esfinganina por acción de la dihidroceramida desaturasa resulta en la formación de ceramida (*N*-acil-esfingosina) (van Meer y Lisman, 2002; Merrill, 2002). A partir de ésta, los esfingolípidos complejos se forman por la adición de diversos residuos de carbohidratos o grupos polares que pueden contener fosfato en la posición 1 de la ceramida (Merrill *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 2004). Una herramienta muy valiosa que ha contribuido a la caracterización de los procesos celulares regulados por esfingolípidos ha sido el empleo de inhibidores naturales o sintéticos de las enzimas clave en la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos.

La esfingofungina C, ISP1 o miriocina, lipoxamicina, haloalaninas y cicloserina han sido utilizadas como inhibidores de la serina palmitoiltransferasa. La fumonisina B₁ (FB₁) (el Apéndice II proporciona más información acerca de esta toxina), y la toxina AAL y la australifungina como inhibidores de la ceramida sintasa (Merrill *et al.*, 1997). La Figura 4 ilustra la vía de síntesis de esfingolípidos y algunos de los sitios de acción de los inhibidores mencionados.

La biosíntesis de los esfingolípidos se lleva a cabo en el ER y en el aparato de Golgi. En el primero se lleva a cabo todo el proceso hasta la acilación y desaturación de la esfinganina y en el Golgi se llevan a cabo las reacciones de glicosilación (Merrill *et al.*, 1997; van Meer y Lisman, 2002). Una vez sintetizados, los esfingolípidos son destinados a membranas celulares específicas en donde realizan sus funciones.

El transporte de esfingolípidos no es al azar, pues su distribución es diferencial en el sistema membranoso de la célula, detectándose poco en mitocondria y retículo endoplasmático y constituyendo entre el 20-35 % de los lípidos de la membrana plasmática en células de mamíferos y de levadura (van Meer y Lisman, 2002).

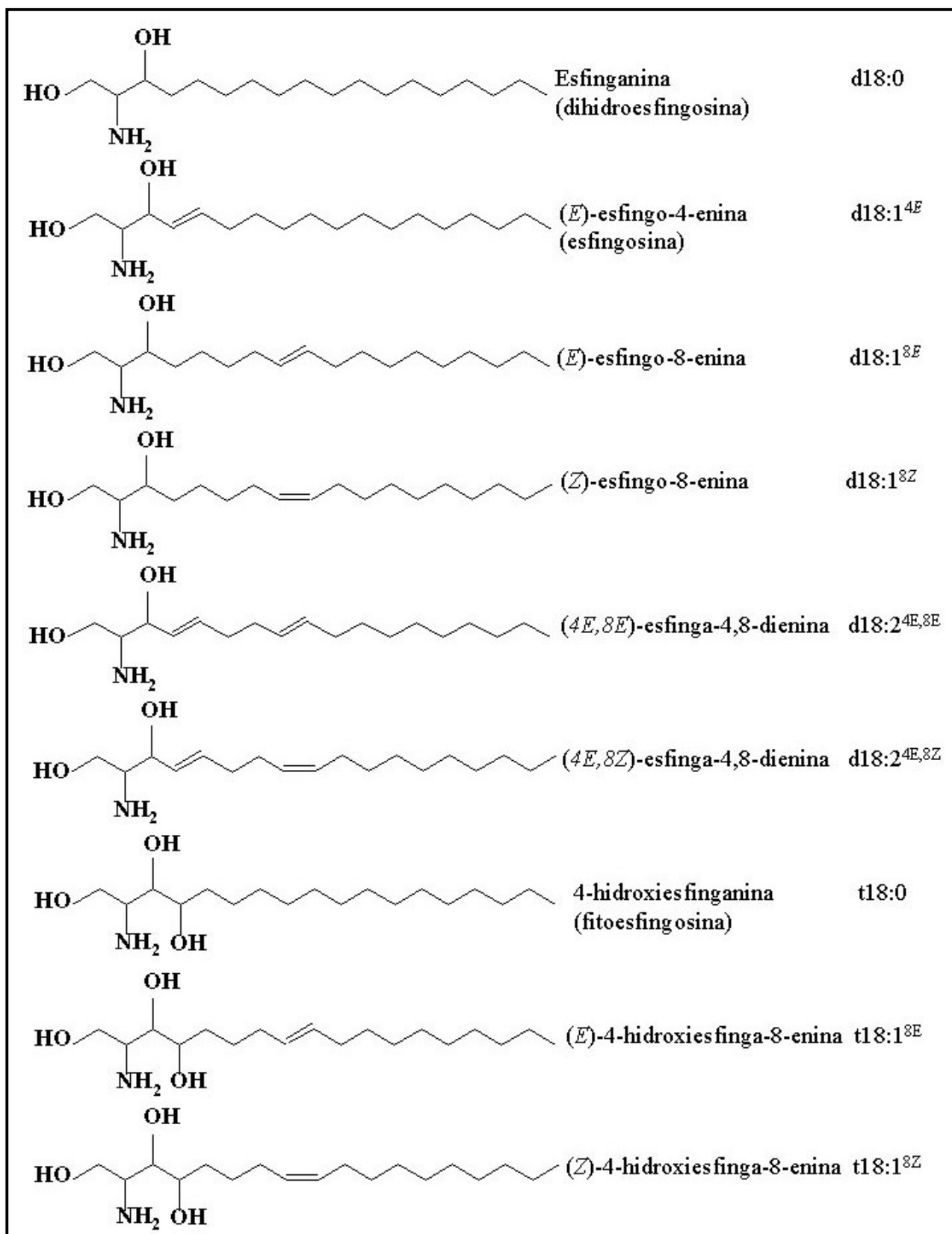


Figura 3. Estructuras de bases de cadena larga comunes de plantas. Todas las bases esfingoides dihidroxiladas son *D-eritro* y todas las bases esfingoides trihidroxiladas tienen una configuración *D-ribo* (Tomada de Sperling y Heinz, 2003).

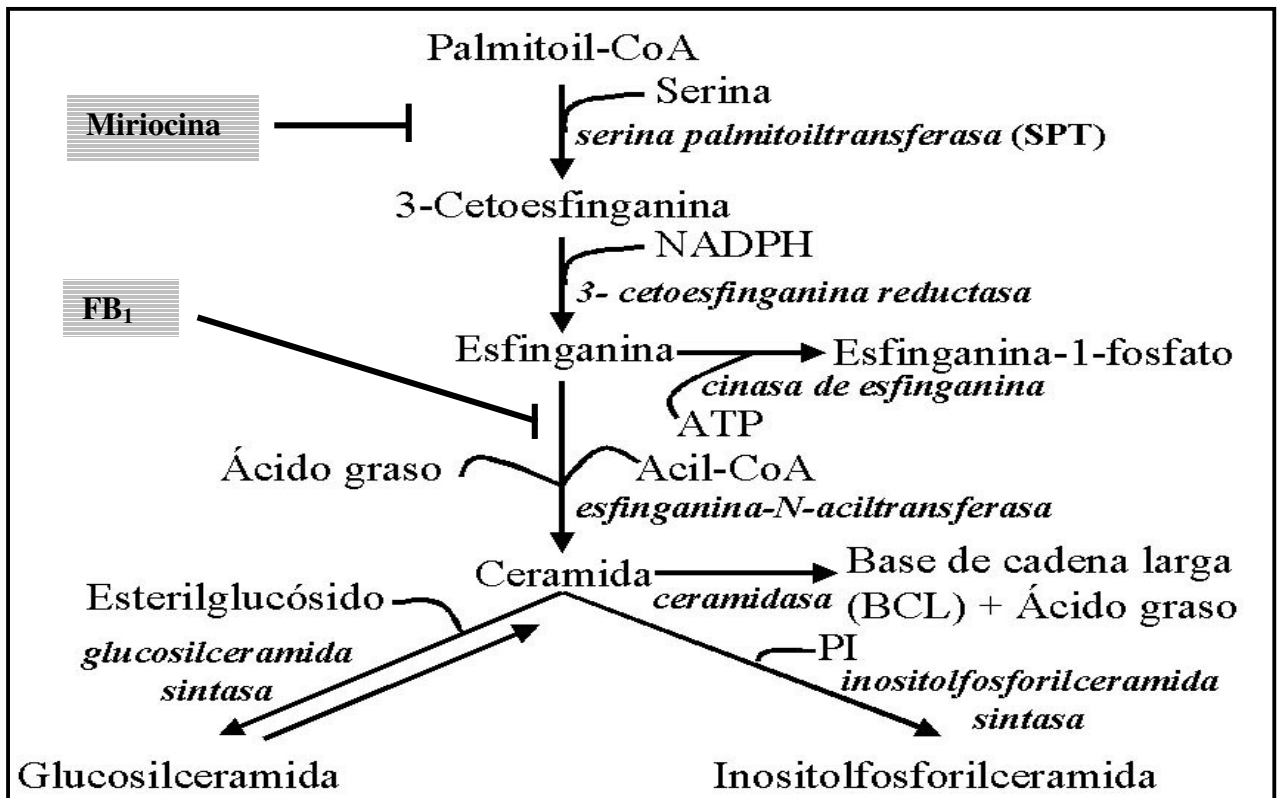


Figura 4. Pasos enzimáticos de la síntesis *de novo* de esfingolípidos demostrada en plantas. Se muestran los blancos de acción de la miriocina y de la FB₁ (Tomado de Lynch, 1999).

c) Esteroles

Son moléculas derivadas del isopreno que tienen funciones esenciales en los eucariontes en general, son componentes de las membranas biológicas, siendo su estructura altamente conservada, y que se caracteriza por tener un sistema tetracíclico hidrofóbico, el ciclopentanoperhidrofenantreno, modificado y monohidroxilado en el carbono de la posición 3 y con cadenas laterales en el carbono 17 (Schrick *et al.*, 2004; Benveniste, 2005). La Figura 5 muestra diferentes tipos de esteroides comunes en plantas. La vía de biosíntesis de esteroides en plantas genera una mezcla de esteroides únicos y que son denominados fitoesteroides (Schrick *et al.*, 2004) y se lleva a cabo en las membranas del RE (Hartmann *et al.*, 2002). Los esteroides han sido detectados en diferentes especies de plantas, encontrándose en diferentes preparaciones como se puede ver en la Tabla II.

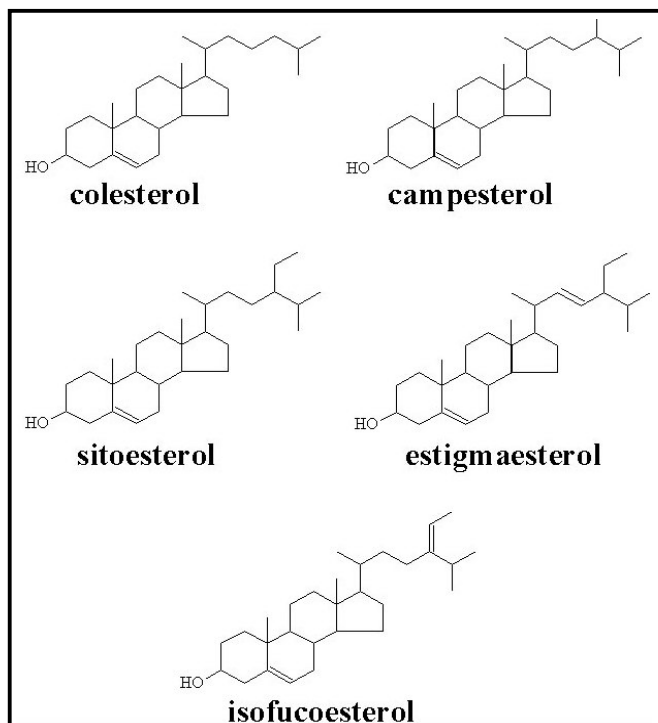


Figura 5. Estructura de diferentes tipos de esteroides presentes en plantas.

En contraste con los organismos animales, en los que su principal esteroide (colesterol) carece de alquilación en el carbono de la posición 24, las plantas sintetizan esteroides modificados con grupos etilo y metilo. El campesterol, es un metilesterol de la planta, el cual es el precursor de los brasinoesteroides (BRs), los cuales juegan un papel importante durante el crecimiento post-embriónico y el desarrollo. Los esteroles como estigmasterol y sitosterol desempeñan papeles importantes a nivel de la membrana plasmática. Se ha encontrado que el estigmasterol modula la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática (Grandmougin *et al.*, 1997). El sitosterol que es el esteroide predominante, regula la integridad de la membrana plasmática y recientemente ha sido postulado como cebador molecular en la síntesis de celulosa (Schrick *et al.*, 2004).

Tabla II. Composición de esteroides de membranas celulares en diversas especies vegetales.

ESPECIE VEGETAL	ESTEROLES	REFERENCIA
Hojas de <i>Phaseolus vulgaris</i> (microsomias)	57% sitoesterol, 34% estigmasterol, 6% campesterol y 2% isofucosterol	Brandt y Benveniste, 1972
Raíces de <i>Zea mays</i> (membrana plasmática)	55% estigmasterol, 27% 24-Metil-colesterol, 14% sitoesterol, 2% colesterol	Grandmougin <i>et al.</i> , 1989
Raíces, de estilos y cortex de <i>Zea mays</i> (membrana plasmática)	19.8% estigmasterol, 13% campesterol, 6.7% sitoesterol, 1.3% isofucosterol	Cowan <i>et al.</i> , 1993; Bohn <i>et al.</i> , 2001
Hojas de <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Pinot Noir (membrana plasmática)	80% sitoesterol, 11% estigmasterol, 5.6% colesterol, 3.4% campesterol	Mas <i>et al.</i> , 1994
Segmentos de hipocotilo de <i>Phaseolus vulgaris</i> Mungo (membrana plasmática)	50% sitoesterol, 34% estigmasterol, 8% campesterol y 6% colesterol	Stallaert y Geuns, 1994
Raíces de <i>Helianthus annuus</i> (membrana plasmática)	49.2% estigmasterol, 37.6% sitoesterol, 13.2% campesterol	
Raíces de <i>Simmondsia chinensis</i> (membrana plasmática)	46.3% sitoesterol, 31.6% estigmasterol, 22.0% campesterol	Burgos y Donaire, 1996
Hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> (membrana plasmática) (DRM) ¹	51.7% estigmasterol, 19.2% 24-metil-colesterol, 15.1% sitoesterol, 14.0% colesterol, 49.3% estigmasterol, 22.8% 24-metil-colesterol, 12.9% sitoesterol, 15.0% colesterol	Mongrand <i>et al.</i> , 2004
Callo de <i>Arabidopsis thaliana</i> (membrana plasmática) (DRM)	79.4% sitoesterol, 8.6% campesterol, trazas de estigmasterol y de colesterol, 81.0% sitoesterol, 10.0% campesterol, 1.2% estigmasterol y 0.2% colesterol	Borner <i>et al.</i> , 2005

¹ DRM son membranas resistentes a solubilización con detergente.

B) Proteínas

El término proteína proviene de la palabra griega *proteios*, que significa «lo primero» el cual fue propuesto por Jöns J. Berzelius en 1838. Las unidades básicas estructurales de las proteínas son los aminoácidos, las cuales están constituidas a partir de un conjunto idéntico de 20 aminoácidos. Las cadenas laterales de estos sillares moleculares de construcción difieren en tamaño, forma, carga, capacidad de establecer puentes de hidrógeno y de actividad química. Las proteínas desempeñan funciones clave en prácticamente todos los procesos biológicos, siendo las responsables de la mayoría de los procesos dinámicos que se llevan a cabo en las membranas biológicas (Singer, 2004).

a) Clasificación de las proteínas membranales

Las proteínas de membrana se clasifican de una manera operativa según la fuerza de su asociación con la bicapa lipídica:

- i) Las proteínas periféricas o extrínsecas. Son aquellas que están unidas a las membranas a través de interacciones electrostáticas y por puentes de hidrógeno, se disocian de la membrana por procedimientos relativamente suaves que dejan intacta la membrana, tales como la exposición a soluciones salinas de elevada fuerza iónica, agentes quelantes de metales o cambios de pH (Singer, 2004).
- ii) Las proteínas integrales, transmembranales o intrínsecas. Están fuertemente unidas a las membranas mediante fuerzas hidrofóbicas y sólo se pueden disociar mediante tratamiento con agentes que destruyen las membranas. Entre éstos se encuentran los disolventes orgánicos, detergentes (como el dodecil sulfato de sodio (SDS), desoxicolato sódico, colato sódico, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), polioxietileno lauril éter (Brij) o el polioxietileno-p-isooctilfenil éter (Tritón X)) y agentes caotrópicos (Voet y Voet, 1990). Este tipo de proteínas tiene naturaleza anfipática debido a los residuos hidrofóbicos (porción transmembranal) que presentan en su estructura y por los residuos hidrofílicos que pueden estar confinados hacia la cara extracelular o hacia la cara citoplasmática de la bicapa lipídica.

Las proteínas hidrofílicas que se asocian a sólo una de las dos caras de la membrana mediante una interacción hidrofóbica, lo hacen a través de lípidos a los que se unen covalentemente. Las proteínas se pueden unir principalmente a cuatro tipos de lípidos: a glucosilfosfatidilinositol (GPI), a ácidos grasos como el ácido mirístico (C₁₄) o el ácido palmítico

(C₁₆) o bien a un lípido fenilado como el farnesilo (C₁₅) o el geranilgeranilo (C₂₀) y a esteroides (Buchanan, 2000).

b) Estructura de las proteínas de membrana

Las proteínas de membrana representan aproximadamente una tercera parte de las proteínas codificadas en el genoma eucariótico, de las cuales menos del 1% se conoce su estructura (Loll, 2003).

Se conoce por lo menos la estructura de aproximadamente 20 proteínas membranales, debido a que pocas han sido cristalizadas a resolución atómica (Pebay-Peyroula y Rosenbusch, 2001). Como ejemplos se tienen: el centro de reacción fotosintético bacteriano (Deisenhofer *et al.*, 1985), la rodopsina bacteriana (Palczewski *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2002), la proteína FhuA (un translocador de lípidos) (Locher *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 2000), la porina de *Escherichia coli* que es considerada un modelo para proteínas canales dependientes de voltaje (Steven *et al.*, 1977; Cowan *et al.*, 1992), un canal iónico MscL (Chang *et al.*, 1998), la citocromo c oxidasa (Iwata *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1996), la parte hidrofílica de una NADH-Q oxidoreductasa (Complejo I), la Q-citocromo c oxidoreductasa (citocromo bc₁), el citocromo c y la ATP sintasa bacteriana y la de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, entre otras (http://blanco.biomol.uci.edu/membrana_proteins_xta.lhtml).

c) Características de las proteínas membranales.

De acuerdo a las estructuras cristalográficas y a las evidencias bioquímicas disponibles se tienen claras las siguientes características:

- i) Una proteína integral, presenta en su estructura dos tipos de regiones: una transmembranal que se caracteriza por contener aminoácidos hidrofóbicos y una o varias regiones que se encuentran fuera de la membrana, denominadas asas hidrofílicas que contienen aminoácidos hidrofílicos.
- ii) Las proteínas integrales contienen un dominio interior hidrofóbico (la parte transmembranal), en el que se presentan interacciones hidrofóbicas entre los residuos no polares de la proteína entre sí y con los lípidos de la bicapa; también pueden presentar un gran número de puentes de hidrógeno entre los grupos C=O y N-H del polipéptido y debido a que este tipo de uniones puede formar una estructura de hélice α , los dominios transmembranales pueden estar arreglados con esa estructura secundaria (Singer, 2004). El análisis de la estructura primaria de la rodopsina bacteriana reveló que la mayor parte de los aminoácidos de estas hélices transmembranales son apolares y que sólo unos pocos

tienen carga. Las hélices α transmembranales constituyen el motivo estructural más común en proteínas de membrana. Sin embargo, con la cristalografía de la porina de la membrana externa de *Escherichia coli* se encontró que este tipo de proteína tiene un tipo de estructura completamente diferente. La estructura está constituida por hojas plegadas β y no contiene hélices α . La distribución de las hojas plegadas β consiste en la unión de cada hebra por puentes de hidrógeno, resultando en una organización antiparalela, formando una única hoja β . La hoja se dobla formando el hueco de un cilindro. La superficie externa de la hoja β es no polar y su interior es muy hidrofílico, esto resulta de la presencia de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos alternados a lo largo de cada hebra β (Singer, 2004).

- iii) La estabilización de la estructura transmembranal está determinada por interacciones hidrofóbicas entre los mismos aminoácidos hidrofóbicos de la estructura secundaria de la proteína y entre estos residuos y la parte hidrofóbica de los diferentes tipos de lípidos membranales (ácidos grasos, el esqueleto esfingoideo y la parte cíclica y planar de los esteroides), así como también por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos polares de la proteína (la ruptura de este tipo de interacción es un proceso bastante desfavorable en el interior de la membrana, porque no hay prácticamente agua para competir por lo grupos polares) y entre éstos y los grupos polares de los diferentes tipos de lípidos de la membrana (Singer, 2004).
- iv) Las proteínas transmembranales pueden ser:
1. Monotópicas.- Son proteínas que presentan un solo cruce transmembranal dentro de la bicapa lipídica, donde la parte hidrofóbica del polipéptido constituida principalmente por aminoácidos no-polares presentan una conformación de hélice α , la cual se ubica dentro de la bicapa. Por otro lado, la parte hidrofílica constituida por residuos polares puede extenderse hacia la fase acuosa a ambos lados de la membrana.
 2. Politópicas.- Son proteínas que presentan más de un cruce transmembranal, es decir son aquellas cadenas polipeptídicas cuya parte hidrofóbica puede presentar una conformación de hélice α o bien de una hoja β dentro de la bicapa y la parte hidrofílica puede formar asas hidrofílicas que conectan a un segmento hidrofóbico con otro, con uno o ambos dominios amino o carboxilo terminal localizándose hacia el mismo o diferente lado de la membrana (Singer, 2004).

d) Propiedades de las proteínas membranales

Las proteínas que se encuentran asociadas a la membrana plasmática, integrales o periféricas, pueden mediar la comunicación entre la célula y sus alrededores. El término comunicación puede referirse a un intercambio de información, de materiales y/o energía. Un panorama completo de cómo es que las células funcionan e interactúan con sus alrededores inmediatos requiere un entendimiento detallado de cómo estas proteínas unidas a la membrana funcionan, no sólo como unidades proteicas sencillas, sino como componentes dinámicos del medio membranal donde residen.

i) Movilidad.

Una propiedad fundamental de las proteínas membranales es su movilidad en el plano de la superficie membranal. Tal movilidad tiene consecuencias para el funcionamiento celular y ha sido demostrado por diferentes grupos de investigación que este comportamiento puede exhibir cuantitativa y cualitativamente diferencias dependiendo del sistema celular utilizado. Muchas proteínas exhiben una movilidad en la superficie celular, lo cual es consistente con lo predicho por el modelo del mosaico fluido, aunque en otros casos pueden presentar otras formas de movilidad y en algunos ejemplos extremos, las proteínas membranales no muestran movilidad en el tiempo y espacio experimentales, siendo este tipo de movilidad a menudo referido como difusión anómala (Brown, 2003), lo cual ha sido explicado de acuerdo al modelo de “cerca o barda de citoesqueleto”, el cual se describe más a detalle en la sección de estructura de las membranas biológicas.

ii) Interacción proteína-lípido.

Otro aspecto importante de considerar es el hecho de que la interacción de las proteínas con los lípidos de la membrana puede tener efectos importantes en su función y localización en la membrana plasmática.

El modelo de lípido anular propone que las proteínas membranales requieren ciertos tipos de lípidos específicos alrededor de la parte transmembranal de la proteína, ya que cuando se extrae de este ambiente lipídico, se ha observado que ciertos lípidos son necesarios para mantener la conformación de la estructura proteica, lo cual indica que estos lípidos son importantes para la funcionalidad de la proteína *in situ* (Datta, 1987).

Por otro lado, se ha encontrado que ciertas proteínas membranales pueden presentar una densidad de flotación ligera (LBD), debido a la capa de colesterol y esfingolípidos que las rodea. Las interacciones con las que se pueden formar este tipo de asociaciones incluyen: interacciones

hidrofóbicas colesterol-esfingolípido-aminoácidos específicos de la región transmembranal y a través de interacciones electrostáticas entre los aminoácidos cargados de la proteína y los grupos polares de carga opuesta del lípido (Anderson y Jacobson, 2002). La caracterización de los motivos estructurales implicados en la interacción de las proteínas con colesterol y esfingolípidos es de primordial importancia. Se ha propuesto un motivo denominado dominio de unión a esfingolípidos (SBD), el cual presenta una estructura de horquilla (hélice α -giro-hélice α ó hebra β -giro-hebra β) con un asa que contiene uno o más residuos aromáticos, los cuales son críticos para la interacción con la parte de azúcar del esfingolípido complejo. Por otro lado, los residuos de aminoácidos básicos del SBD pueden estabilizar el complejo a través de interacciones electrostáticas con el grupo fosfato cargado negativamente del esfingolípido complejo. Obviamente, los residuos aromáticos planares del SBD interactuarían con la unidad de carbohidrato del esfingolípido, mientras que los residuos aromáticos de segmentos transmembranales de la proteína interactuarían en la interfase polar/apolar cerca de la región carbonilo del lípido. Esto no sucedería para el caso de los residuos básicos, los cuales juegan un papel similar en los segmentos SBD y transmembranales (Fantini, 2003). Por lo tanto, de acuerdo a este modelo de cáscara de lípido, este tipo de asociaciones lípido-proteína puede tener dos efectos muy importantes: aumentar la estabilidad estructural de la proteína (Anderson y Jacobson, 2002), actuando los lípidos como chaperones moleculares (Fantini, 2003) y determinar el destino membranal de la proteína (Anderson y Jacobson, 2002).

e) Tipos de proteínas de la membrana plasmática de plantas

La membrana plasmática constituye la interfase entre la célula y sus alrededores. Esta posición implica un amplio rango de funciones importantes, como el transporte de componentes dentro y fuera de la célula, comunicación con el exterior celular y la defensa contra patógenos invasores, funciones que son llevadas a cabo por proteínas de transporte, proteínas implicadas en el tráfico membranal y cinasas receptoras, entre otras (Alexandersson *et al.*, 2004). La identificación de estas proteínas es necesaria para poder entender mejor tales eventos celulares (Santoni *et al.*, 2000). La funcionalidad de las proteínas membranales se regula a través de su localización, su unión a ligandos, sus modificaciones post-traduccionales (fosforilación, glicosilación, isoprenilación, acetilación, farnesilación entre otras) (Nühse *et al.*, 2004, Thurston *et al.*, 2005) y por su estabilidad. La mayor parte de estos parámetros son poco predecibles a partir de su estructura primaria, por lo que es necesario examinar la propia proteína en términos de su conformación tridimensional y del estudio de su función (Nühse *et al.*, 2004).

En particular, existen pocos reportes de proteómica de la membrana plasmática de plantas debido a que los genomas de sólo tres especies de plantas han sido secuenciados completamente, *Arabidopsis thaliana*, *Populus* y *Oryza sativa* (Thurston *et al.*, 2005) y además las proteínas membranales presentan la dificultad de tener una baja solubilidad, haciendo difícil su aislamiento y por lo tanto su identificación. Sólo una minoría ha sido identificada (Marmagnet *et al.*, 2004), habiéndose realizado la mayor parte del trabajo de proteómica de la membrana plasmática con *Arabidopsis*, si bien otras plantas como arroz, tabaco y tomate también han sido estudiadas. Estos trabajos de proteómica han utilizado como estrategia general la separación bidimensional de proteínas, que consiste en la separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (primera dimensión) y posteriormente se separan de acuerdo a su peso molecular (segunda dimensión). Las proteínas pueden ser usualmente identificadas por el análisis del péptido utilizando la espectrometría de masas como la técnica de espectrometría de masas en tiempo de vuelo empleando una matriz asistida por ionización/desorción de láser (MALDI-ToF-MS) o a través de la espectrometría de masas de la secuenciación de la masa peptídica con ionización por electroaspersor (ESI-MS) (Thurston *et al.*, 2005), en las que como fase final se realiza la identificación de la proteína al comparar las secuencias de los fragmentos con las de bancos de datos de secuencias conocidas disponibles. Algunos trabajos utilizan la fosforilación como un enfoque adicional denominado fosfoproteómica (Nühse *et al.*, 2004; Thurston *et al.*, 2005). El apéndice III resume algunas proteínas de la membrana plasmática que han sido identificadas experimentalmente en diferentes especies vegetales y se muestran clasificadas de acuerdo a su función. La mayor parte de la identificación de estas proteínas membranales se ha realizado en *Arabidopsis thaliana*, encontrándose implicadas en diferentes procesos celulares: 17% en transporte, 16% en transducción de señales, 9% en estrés, 9% en tráfico vesicular, 6% como proteínas asociadas a pared celular y ancladas a glucosilfosfatidilinositol (GPI) y 3% en la organización celular (Alexandersson *et al.*, 2004).

IV. ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

A) Técnicas de estudio de las membranas.

Las primeras investigaciones para estudiar la estructura y función de las membranas fueron estudios físico-químicos utilizando membranas artificiales hechas a partir de uno o varios tipos de lípidos (Edidin, 2003). Se han utilizado membranas modelo principalmente de dos tipos: bicapas lipídicas construidas a partir de dos monocapas con composición diferente y vesículas unilamlares gigantes (GUVs); en ambos sistemas pueden determinarse cambios de fases

(Dietrich *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos de estas membranas simplificadas permitieron la exploración de las membranas celulares, las cuales a diferencia de las primeras, se encuentran enriquecidas en proteínas y contienen una gran diversidad lipídica. La fisicoquímica provee información de cómo los lípidos se asocian uno con otro y sobre su interacción dinámica. Sin embargo, es difícil determinar la interacción dinámica entre los componentes de las membranas de células vivas en especial de las proteínas membranales entre ellas y con los lípidos. En estos resultados a menudo la resolución espacial ha sido sacrificada por la resolución temporal y viceversa. Pero en los últimos años, nuevas técnicas han permitido visualizar la estructura de la membrana celular y su dinámica en escalas que concuerdan con los estudios de membranas modelo (Edidin, 2003). Las mediciones cuantitativas de la dinámica membranal son posibles con técnicas como la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo, las de entrecruzamiento químico, de rastreo de partícula sencilla, de atrapamiento óptico utilizando pinzas de láser (Vereb *et al.*, 2003), así como nuevas técnicas de microscopía, como la microscopía de fuerza fotónica y la microscopía de moléculas sencillas basada en fluorescencia, permitiendo el estudio del comportamiento dinámico de lípidos individuales o proteínas con precisiones posicionales de 7-40 nm. Todas estas técnicas permiten realizar estudios *in vivo*. Algunas de estas técnicas se describen a continuación:

a) Técnicas con fluorescencia.

i) Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP).

Es una técnica que revela la difusión de proteínas o lípidos marcados fluorescentemente, desde un área grande no blanqueada, hacia una mancha pequeña fotoblanqueada de 1-2.5 μm en diámetro típicamente. Después de un corto pulso de láser de alta-intensidad (pulso de blanqueo), la recuperación de la fluorescencia es rastreada con un microscopio de fluorescencia. De los experimentos de FRAP se puede tener información del coeficiente de difusión de moléculas móviles y, si se presenta, la cantidad de moléculas que no se mueven sobre la escala de tiempo del experimento, y que constituye la fracción inmóvil. Modificando el tamaño del área fotoblanqueada se puede obtener información adicional sobre barreras de difusión en la membrana celular. Una barrera para la difusión lateral, resulta por tanto en una disminución de la fracción móvil con un aumento en el diámetro del área blanqueada.

ii) Transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET).

El FRET se ha utilizado comúnmente para el estudio de interacciones entre moléculas y ha sido aplicado en el estudio de la organización membranal. En el FRET, una molécula

fluorescente excitada, el donador, transfiere su energía de manera no-radiante a una segunda molécula fluorescente, el receptor, donde el espectro de emisión del donador se encuentra aproximadamente en el mismo rango de longitud de onda que el espectro de excitación del receptor, por lo que, para que exista una transferencia de energía se requiere que ambos tipos de moléculas se encuentran en proximidad (0.1-10 nm). La eficiencia del proceso de transferencia es fuertemente dependiente de la distancia. Por ello, midiendo la dependencia de la eficiencia del FRET sobre la densidad del aceptor, se puede obtener información de la co-distribución de moléculas en la membrana celular (Kenworthy y Edidin, 1998; Varma y Mayor, 1998; Kenworthy *et al.*, 2000; Lommerse *et al.*, 2004).

b) Entrecruzamiento químico.

De manera similar al FRET, esta técnica permite determinar posibles interacciones entre los diferentes componentes membranales. Básicamente consiste en utilizar entrecruzadores químicos que son reactivos mono o bifuncionales, los cuales pueden interactuar con grupos funcionales que se encuentran en las moléculas de interés; por ejemplo un lípido con uno o dos grupos químicos y marcado puede reaccionar con los grupos funcionales afines en las proteínas vecinas. Solo si interactúan éstos, el entrecruzador reaccionaría por ambos grupos, emitiendo una señal que puede detectarse.

c) Seguimiento de partícula sencilla.

Utiliza una partícula, usualmente una pequeña gota de oro (aprox. 40 nm), la cual es cubierta con un anticuerpo dirigido contra la proteína membranal de interés. Una vez que el anticuerpo reacciona con la molécula blanco en la membrana celular, el movimiento del anticuerpo junto con la gota de oro revela el movimiento de la molécula blanco. Una cámara, acoplada a un microscopio equipado con un contraste de interferencia diferencial (DIC) puede grabar este movimiento. Esta técnica ofrece una precisión temporal extremadamente alta (menos de décimas de microsegundo) y posicional (típicamente 7-40 nm), así como la posibilidad de grabar largas trayectorias de la partícula (arriba de 10 min).

d) Microscopía de fuerza fotónica.

El concepto de utilizar una gota cubierta de anticuerpo se puede utilizar en una técnica donde la gota es atrapada con un rayo láser altamente enfocado, a menudo conocido como una trampa óptica o pinzas ópticas de láser. De este modo, aquellas barreras que puede presentar la membrana celular pueden ser detectadas por arrastre de la gota atrapada, la cual puede encontrarse anclada a una o más proteínas membranales a lo largo de la superficie celular. La

trampa de láser y el seguimiento de partícula sencilla pueden combinarse: la trampa de láser puede ser utilizada para determinar el movimiento de la gota con un potencial superficial y su difusión local puede ser medida por el seguimiento de partícula de alta resolución. Esta combinación ha sido denominada “microscopía de fuerza fotónica”, la cual hace posible detectar fluctuaciones térmicas de la posición de la gota atrapada con una resolución de nanómetros y décimas de segundo (0.3 s) (Lommerse *et al.*, 2004).

B) Modelo membranar actual.

A pesar de que el modelo clásico del mosaico fluido de Singer y Nicolson ha sido utilizado como una herramienta valiosa para explicar la mayor parte de los fenómenos que suceden a nivel de las membranas biológicas, en las últimas dos décadas, datos experimentales han demostrado que la compartimentalización de ciertos componentes membranales puede ser importante para que se lleven a cabo procesos que requieren la agrupación de componentes membranales específicos, como en el caso de una transducción de señales efectiva (Vereb *et al.*, 2003). En esta propuesta, las proteínas y lípidos pueden ser temporalmente confinados a dominios, áreas cuya composición, propiedades físicas y función difieren del promedio del resto de la membrana (Edidin y Stroynowski, 1991), por lo que son capaces de modular funciones biológicas de aquellas moléculas que quedan restringidas a estas regiones. Actualmente, han sido demostrados tres tipos de heterogeneidades en la membrana plasmática:

a) Caveolas.

Una de las primeras estructuras de la membrana plasmática estudiadas fueron las caveolas. Son invaginaciones que presentan la forma de un ánfora de un tamaño pequeño (~60 nm de diámetro), cuyo componente principal es la proteína caveolina (de ahí la denominación), la cual se une al colesterol. La cubierta citoplásmica de la caveola puede ocupar un área por arriba de los 150 nm de diámetro y se ha demostrado que cuando se remueve el colesterol de la membrana, la estructura de la caveola se destruye (Lommerse *et al.*, 2004). Por diversos estudios se conoce que las caveolas están implicadas en diferentes funciones celulares como son el transporte de colesterol, la endocitosis y la transducción de señales (Kurzchalia y Parton, 1999; Kenworthy, 2002; Lommerse *et al.*, 2004).

b) Red de actina asociada a la membrana.

Este tipo de heterogeneidad se refiere a un esqueleto membranar que impone barreras eficientes sobre la difusión de los diferentes constituyentes de la membrana. El tamaño de estos dominios de difusión se determinó por el diámetro de la malla de la red del esqueleto membranar

y se ha demostrado que puede ser de 300-600 nm (Lommerse *et al.*, 2004). El modelo de “barda de citoesqueleto” fue postulado al caracterizar la regulación por el citoesqueleto de una proteína transportadora en diferentes tipos celulares. Las evidencias experimentales se basaron en mediciones con tres técnicas: Fluorescencia recuperada después de fotoblanqueo (FRAP), seguimiento de una partícula sencilla (single particle tracking, SPT) y experimentos con pinzas de láser (laser tweezers). Este modelo del corral dinámico (Leitner *et al.*, 2000) propone que el movimiento de proteínas transmembranales está confinado a ciertas microregiones, debido a que su porción citoplasmática estéricamente “sensa” una malla del citoesqueleto (“barda” o “cerca”), la cual se localiza muy cerca de la cara citoplasmática de la membrana celular y por lo tanto, sugiere que algunas proteínas transmembranales pueden ser compartimentalizadas en ciertas áreas membranales por este mecanismo, la Figura 6 ilustra este modelo (Lommerse *et al.*, 2004).

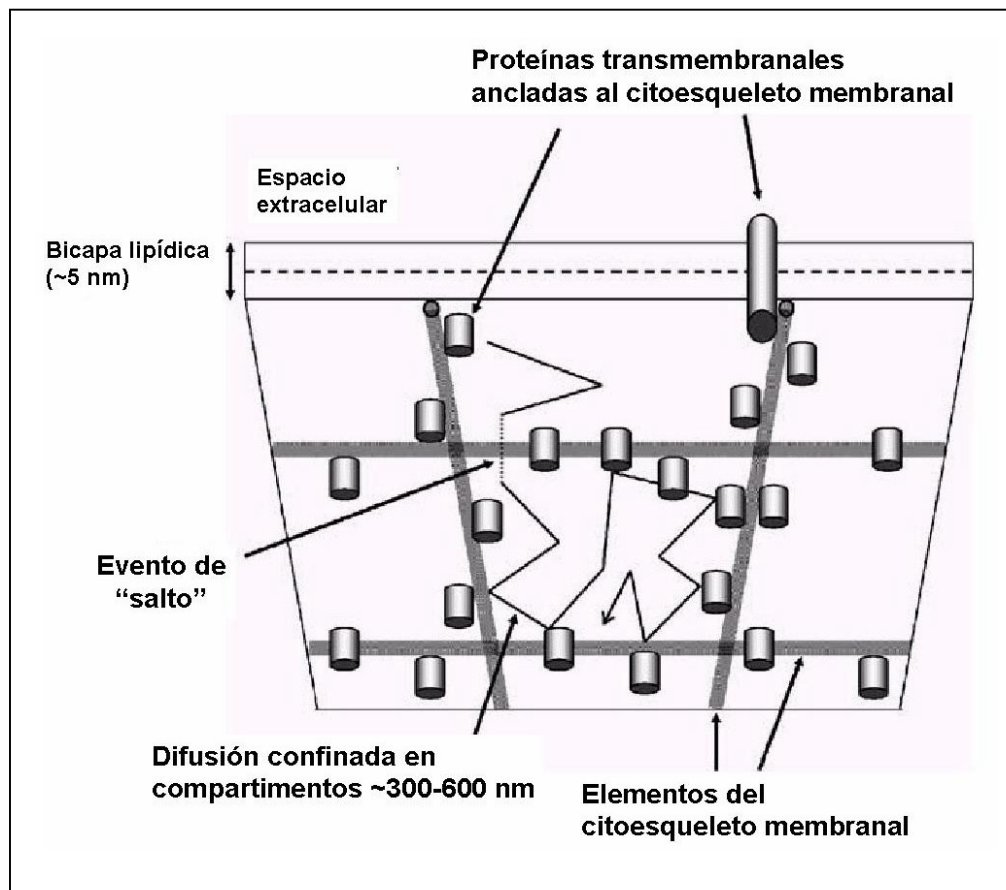


Figura 6. Modelo de “barda de citoesqueleto”. En el dibujo se ilustra la parte citoplasmática de la membrana plasmática. Las proteínas transmembranales son ancladas a la red de actina del citoesqueleto asociada a la membrana y efectivamente las proteínas actúan como estacas en la barda, la cual confina temporalmente el movimiento de proteínas y lípidos (Lommerse *et al.*, 2004).

c) Balsas lipídicas.

Este concepto se originó de estudios sobre la polaridad de células epiteliales, postulándose como ensamblajes dinámicos enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, que se mueven dentro de la bicapa fluida (Simons e Ikonen, 1997). El modelo propone que dentro de la fase líquida desordenada de la membrana plasmática existen ciertas regiones que presentan una fase líquida ordenada gracias a una composición lipídica enriquecida en esfingolípidos y esteroides, lo cual les confiere una menor fluidez y movilidad membranal (Simons e Ikonen, 1997; Simons y Toomre, 2000). Esto puede ser interpretado como una modulación diferencial de la arquitectura membranal, que le permite la continua restructuración dinámica de zonas con altos niveles de organización que contienen moléculas complejas y que surgen de acuerdo a las necesidades de la célula y de los estímulos surgidos en su ambiente (Vereb *et al.*, 2003).

i) Diferentes denominaciones de las balsas lipídicas.

Las balsas de lípidos (“lipid rafts”) también suelen denominarse como microdominios, membranas resistentes a la solubilización por detergente no-iónico (DRMs), membranas enriquecidas en glicolípidos (GEMs), dominios enriquecidos en glicolípidos insolubles en detergente (DIGs), membranas insolubles en tritón (TIM), fracciones insolubles en tritón de baja densidad (LDTI) y fracciones flotantes insolubles en tritón (TIFF) (Brown y London, 1998).

ii) Métodos de estudio de las balsas lipídicas.

Las evidencias que argumentan la existencia de los microdominios han sido aportadas principalmente por estudios biofísicos en sistemas modelo, extracción con detergentes, efecto de la remoción de colesterol y el análisis de la presencia de componentes característicos de microdominios. La extracción con tritón X-100 a 4 °C es el ensayo más ampliamente utilizado para demostrar la existencia y residencia de los microdominios, debido a que cuando la membrana plasmática es tratada de este modo, una parte de ella es solubilizada y otra permanece insoluble, siendo esta última la fracción donde se encuentran los microdominios. El análisis de componentes putativos de estas regiones ha identificado a proteínas ancladas a GPI (GAPs) y proteínas G ancladas a lípidos entre otras (Munro, 2003).

Se tiene conocimiento de que los microdominios son entidades muy pequeñas para poder ser observadas con microscopía de luz, por lo cual han sido utilizadas técnicas basadas en la microscopía electrónica y en la fluorescencia que presentan limitantes menores con respecto al tamaño del objeto a detectar y a su tiempo de residencia. Dentro de estas herramientas, los microdominios han sido estudiados a través del uso de: FRET, una modalidad de ésta, el FRAP

(Kenworthy y Edidin, 1998; Varma y Mayor, 1998), por entrecruzamiento químico (Friedrichson y Kurzchalia, 1998), por seguimiento de partículas sencillas (Pralle *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 2001) y por microscopía de dos fotones (Gaus *et al.*, 2003).

Respecto al tamaño o diámetros de los microdominios existen diversos reportes que les conceden una dimensión de los 10 a los 700 nm (Munro, 2003), hasta algunos reportes del orden de micrómetros (Lommerse *et al.*, 2004).

iii) Detección de las balsas lipídicas en diferentes tipos celulares.

Las balsas lipídicas han sido detectadas o aisladas de una amplia variedad de tipos celulares de mamíferos, incluyendo diversos tipos de células epiteliales, de células hematopoyéticas, células endoteliales, adipocitos (Brown y London, 1998), células del músculo (Fridriksson *et al.*, 1999; Schütz *et al.*, 2000), células del neuroblastoma (Brown y London, 1998), neuronas (Hering *et al.*, 2003), espermatozoides y células de melanomas (Brown y London, 1998). También han sido obtenidos de levadura (Bagnat *et al.*, 2000; Hearn *et al.*, 2003; Idkowiak-Baldys *et al.*, 2004), de un protozoario (Laughlin *et al.*, 2004)) y en plantas han sido obtenidos de hojas de *Nicotiana tabacum* (Peskan *et al.*, 2000; Mongrand *et al.*, 2004), de callos de *Arabidopsis* (Shaollari *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005; Bhat *et al.*, 2005) y de hojas de *Hordeum vulgare* (Bhat *et al.*, 2005).

iv) Modelo estructural propuesto para las balsas lipídicas.

Lípidos de las balsas lipídicas.

Se ha propuesto un modelo para la organización de la membrana plasmática considerando la existencia de las balsas lipídicas. Este modelo propone que parte del colesterol y de los esfingolípidos de la cara externa de la membrana plasmática no está distribuída de manera uniforme, sino que presenta una fase ordenada (l_o) que flota en una fase líquida desordenada (l_d) más extensa. La gran afinidad entre esfingolípidos y colesterol que permite su asociación espontánea y estable radica, por una parte, en la rigidez estructural de la cadena alifática de la esfingosina de la ceramida de los esfingolípidos, ya que es una cadena hidrofóbica saturada con sus carbonos en orientación trans. Por otra parte, está la rigidez de la estructura de la parte cíclica y plana del colesterol y de su cadena alifática, que favorece la disposición trans de las colas hidrocarbonadas adyacentes (Ahmed *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2001). Adicionalmente, las partes polares de las dos moléculas, el hidroxilo 3' del colesterol y el grupo amino del C₂ de la ceramida, pueden formar un puente de hidrógeno promoviendo la asociación entre ambos tipos de compuestos. Igualmente, otras porciones hidrofílicas de los esfingolípidos, como la

fosfocolina (en la esfingosina) o carbohidratos (en los glicolípidos), también pueden dar cohesión a estos agregados lipídicos (Curatolo, 1987). El resultado es una región con estructuras rígidas, compactas, estables, con un alto ordenamiento y baja movilidad de la parte hidrofóbica de sus componentes, que origina una fase líquida ordenada (van Blitterswijk *et al.*, 1987).

Proteínas de las balsas lipídicas.

Se ha propuesto que las propiedades físicas de los microdominios pueden depender de las proteínas de los mismos microdominios o bien de aquellas que están situadas en sus fronteras con la fase fluida de la bicapa lipídica. En el caso de la cara externa de la membrana plasmática, se ha sugerido que los principales residentes de los microdominios son proteínas ancladas a la bicapa como las proteínas G ancladas a lípidos o por unión covalente con glicosilfosfatidilinositol (GPI), un típico lípido-ancla (Munro, 2003), y que han sido denominadas como proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GAPs) y las cuales se ha sugerido que pueden estar implicadas en vías de señalamiento. El anclaje de proteínas a GPI se encuentra presente en todos los organismos eucarióticos, y las GAPs pertenecen a numerosas familias de proteínas. Debido a que la unión del fosfatidilinositol a la proteína es susceptible a la acción de fosfolipasas específicas, las GAPs pueden existir tanto en una forma soluble como en una forma asociada a la membrana. Algunas proteínas con arabinogalactanos (AGPs) están ancladas a GPI (Borner *et al.*, 2003). Existe evidencia de que este tipo de AGPs tiene múltiples papeles en el desarrollo de las plantas (Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000). La Figura 7 ilustra el modelo estructural propuesto para las balsas lipídicas.

v) Funciones generales de las balsas lipídicas.

Muchas evidencias sugieren que los microdominios lipídicos juegan un papel importante en diversos procesos biológicos, incluyendo numerosas vías de transducción de señales, apoptosis, adhesión celular y migración, transmisión sináptica, organización del citoesqueleto y en la clasificación proteica durante la exocitosis y la endocitosis. Además de su participación en las funciones celulares normales, se ha sugerido que estos microdominios pueden ser el punto celular de entrada de una amplia variedad de virus, bacterias y toxinas (Munro, 2003).

Las balsas lipídicas en la transducción de señales.

Es probable que los dominios ricos en colesterol y esfingolípidos en la cara externa estén conectados con dominios lipídicos en la cara interna y con componentes de vías de transducción de señales, en particular proteínas G y cinasas de tirosina (no receptores) que se encuentren ancladas selectivamente en la cara interna de la membrana plasmática a través de múltiples

cadena acilada (Munro, 2003). De hecho, se ha propuesto que los lípidos de estas regiones funcionan como plataformas de señalamiento, ya que podrían acoplar las señales percibidas por la membrana externa con vías de señalamiento dentro de la célula (Simons e Ikonen, 1997).

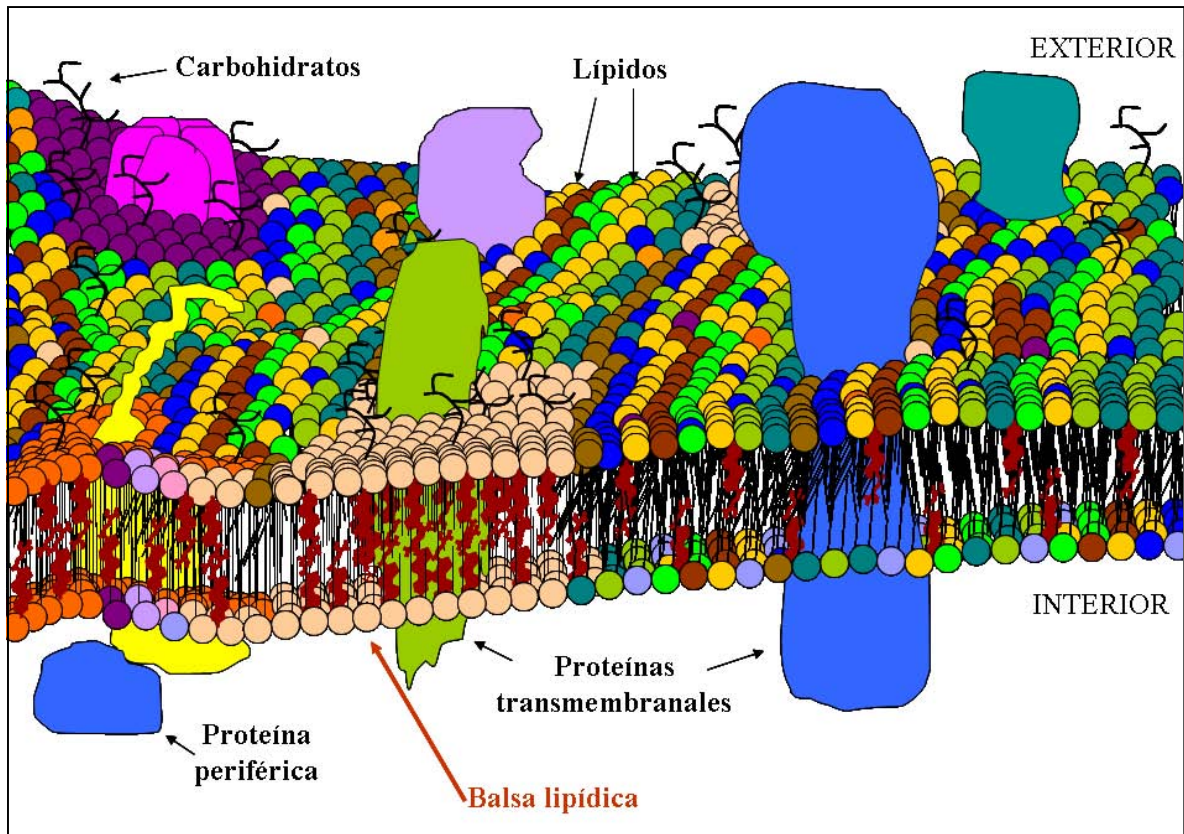


Figura 7. Modelo estructural propuesto para las balsas lipídicas. El dibujo ilustra una membrana plasmática donde los dominios de color morado, naranja y rosa representan balsas lipídicas coexistiendo con el resto de la membrana plasmática, la cual está representada por la extensa zona de lípidos y proteínas de múltiples colores.

De manera general, los microdominios podrían reclutar proteínas en un micro-ambiente tal que favorezca el estado de fosforilación o defosforilación de otras, allegando fosfatasas y cinasas selectivamente y resultando probablemente en posteriores etapas de señalización. A este respecto existen numerosas vías de señalización que implican la participación probada de los microdominios, por citar algunos ejemplos podemos mencionar la vía de señalización de la inmunoglobulina E, siendo éste el primer proceso de señalamiento que convincentemente demostró la implicación de los microdominios durante la respuesta inmune alérgica. Esta vía de señalamiento se activa cuando la IgE se une al segmento Fc que es un receptor ($F_{c\epsilon}RI$) de la membrana plasmática de mastocitos y basófilos. Las balsas lipídicas también están involucradas

en el señalamiento mediado por el receptor del antígeno de las células T (TCR), que es un receptor que presenta multisubunidades y participa en el reconocimiento inmunológico. Este receptor además involucra procesos de fosforilación en motivos de activación propios de receptores de tirosina (ITAMs) a través de cinasas de tirosina tales como las de la familia Src, que son doblemente aciladas y no son receptores. Diversas proteínas ancladas a GPI, como algunas fosfatasa, contribuyen a la amplificación de los eventos de activación de las células T (Simons y Toomre, 2000; Miceli, 2001).

Otros procesos de señalamiento incluyen al factor neurotrópico derivado de células gliales (GDNF), que pertenecen a una familia de ligandos que son importantes para el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso, así como el señalamiento por RAS, que es un tipo de GTPasas pequeñas y que son el centro de diversos procesos de señalamiento. Estas proteínas G actúan como interruptores que, cuando son activados, pueden reclutar cinasas de treonina/serina de la membrana plasmática, las cuales a su vez podrían activar cinasas activadas por mitógeno (MAPK) o bien a otros blancos. A pesar de que se ha podido inferir la participación de los microdominios en las vías de transducción de señales, hasta ahora no se conoce exactamente el mecanismo implicado en la interacción de la señal con el receptor a través de los microdominios, sin embargo, sí se ha podido inferir que estas interacciones que se efectúan en el ensamble de las balsas lipídicas son dinámicas y reversibles (Simons y Toomre, 2000).

Balsas lipídicas y patogénesis.

Otro aspecto bien documentado durante los últimos años es la evidencia de que diversos patógenos (bacterias, parásitos y virus) y toxinas bacterianas utilizan preferencialmente microdominios del hospedero en el inicio de su interacción con sus blancos celulares (Brown y London, 1998; van der Goot y Harder, 2001; Munro, 2003; Mañes *et al.*, 2003; Lafont *et al.*, 2004; Bhat *et al.*, 2005).

Dentro de los diversos patógenos se encuentran *Escherichia coli*, *Mycobacterium bovis*, *Campylobacter jejuni*, *Plasmodium falciparum*, (Brown y London, 1998; Grassme *et al.*, 2003; Lafont *et al.*, 2004), *Pseudomonas aeruginosa* (Grassme *et al.*, 2003; Lafont *et al.*, 2004) y *Shigella flexneri* (Lafont *et al.*, 2004; van der Goot *et al.*, 2004). El virus SV40, que puede internalizar en las células de mamíferos a través de las caveolas y ser liberados en el lumen del retículo endoplásmico, así como el virus de la influenza, el virus del VIH y el virus del ébola. Se ha demostrado que estos virus utilizan microdominios en diferentes fases de la infección (van der Goot y Harder, 2001). En el caso de plantas se ha demostrado que el patógeno *Blumeria graminis*

f. sp. *hordei* induce la formación de microdominios en la membrana plasmática de cebada (*Hordeum vulgare*) y de *Arabidopsis* reclutando y excluyendo ciertas proteínas (Bhat *et al.*, 2005).

Además, las balsas lipídicas pueden funcionar como depósitos concentradores de moléculas específicas y como ejemplos tenemos la toxina del cólera, la aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, la estreptolisina O, lisenina y la citolisina de *Vibrio cholera*. Todas estas toxinas requieren de componentes de microdominios en las células hospederas para la formación de canales, siendo el colesterol el receptor para la estreptolisina O, la esfingomielina para la lisenina y el colesterol y la esfingomielina para la citolisina del cólera. Otras toxinas promueven cascadas de señalización en el hospedero como las moléculas de lipopolisacáridos (LPS), que son producidas por todas las bacterias Gram negativas (Brown y London, 1998; van der Goot y Harder, 2001; Lafont *et al.*, 2004).

ANTECEDENTES GENERALES

Recientemente, se ha encontrado que los esfingolípidos son mediadores en vías de señalización en células vegetales (Worrall *et al.*, 2003). La esfingosina-1-fosfato, que participa en procesos de señalamiento en células animales, y la fitoesfingosina-1-fosfato están implicadas en la vía de transducción de la percepción de ácido abscísico por las células guarda para la apertura y cierre de los estomas (Ng *et al.*, 2001; Coursol *et al.*, 2005). Sin embargo, la función fundamental de los esfingolípidos está relacionada con sus propiedades fisicoquímicas y su naturaleza anfipática, mismas que los llevan a ser componentes abundantes de las membranas celulares de todas las plantas y desde donde además pueden ejercer su acción de segundos mensajeros.

Considerando que los lípidos esfingoideos son lípidos que junto con los esteroides se encuentran enriquecidos en las balsas lipídicas membranales (Peskan *et al.*, 2000; Mongrand *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005), el desbalance en lípidos esfingoideos membranales generado por adición de un inhibidor como la Fumonisina B₁ (FB₁) puede aprovecharse para estudiar su impacto en la formación y estabilidad de los microdominios membranales. Esta acción de la toxina permite diseñar un sistema experimental en el que se estudien los efectos de los niveles de esfingolípidos membranales en la membrana plasmática misma y en el que se explore si los cambios cuantitativos en esfingolípidos endógenos pueden modular la existencia de balsas lipídicas.

ANTECEDENTES INMEDIATOS DE ESTE PROYECTO

En el laboratorio, hemos encontrado que la germinación de embriones de *Zea mays* en presencia de 10 μM de FB₁ durante 24 h inhibe a la esfinganina-*N*-aciltransferasa y como consecuencias de ello, en la membrana observamos:

1. Aumento de 10 veces de la base esfingoidea esfinganina en la membrana plasmática.
2. Aumento de 7 veces de la base esfingoidea fitoesfingosina en las membranas totales.
3. Disminución (no cuantificada) en los niveles de ceramida de la membrana plasmática.
4. Disminución en la fluidez de la membrana plasmática (Gutiérrez, 2005; Gutiérrez-Najera *et al.*, 2005).
5. Inhibición de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (una enzima que ha sido reportada como residente de microdominios), inducida por un descenso de ceramida, (Mongrand *et al.*, 2004; Shaollari *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005).

6. Disminución en los niveles de fosforilación de algunos polipéptidos de membrana plasmática (Carmona, 2003).

En esta condición, hemos detectado la ausencia de la toxina en la membrana plasmática.

HIPÓTESIS

Existen balsas lipídicas en la membrana plasmática de diferentes especies vegetales, que por estar enriquecidas en esfingolípidos son resistentes a la solubilización por detergente (DRM) y se modifican por la inhibición de la síntesis *de novo* de estos lípidos.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar la presencia de balsas lipídicas en la membrana plasmática de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Purificar membranas plasmáticas de tres especies vegetales a partir de las cuales se puedan purificar DRMs.
2. Establecer un procedimiento para aislar DRMs utilizando a *N. tabacum* como referencia e identificarlas de acuerdo a su:
 - a. Extractibilidad en Tritón X-100 a 4 °C.
 - b. Ultraestructura en microscopía electrónica de transmisión.
 - c. Nivel de ATPasa de H⁺ (como marcador de DRM).
 - d. Perfil de lípidos.
3. Comparar los parámetros 2a-d con los de las fracciones de membrana plasmática.
4. Aislar fracciones de DRM de tejidos tratados con FB₁ y determinar:
 - a. Nivel de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (como marcador de DRM).
 - b. Su ultraestructura.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Material biológico.

Durante el presente trabajo se utilizaron 3 especies vegetales, una monocotiledónea y dos dicotiledóneas, que fueron embriones de semillas de *Zea mays* (raza criolla Chalqueño), hojas de *Phaseolus vulgaris* (var. Canario 60) y hojas de *Nicotiana tabacum* (línea T11). Esta última fue generosamente proporcionada por el Dr. Felipe Cruz García (Fac. Química, UNAM, México).

A) Germinación de los embriones de semillas de *Zea mays* (raza criolla Chalqueño).

Los embriones de semillas de *Zea mays* (raza criolla Chalqueño) fueron embebidos 24 h. El ensayo de imbibición se realizó como sigue:

1. Los embriones se desinfectaron con hipoclorito de sodio diluído 1:10 a partir de una solución comercial al 5.5% de cloro activo, haciendo 3 lavados de 2 min cada uno.
2. Posteriormente, los embriones fueron enjuagados 3 veces con H₂O estéril y colocados en cajas de Petri estériles con agarosa al 1% disuelta en medio de imbibición diluído 1:2 (una parte de medio por dos de agua) (ver composición en la Tabla III). En el caso de los embriones embebidos con la Fumonisina B₁ se utilizó como concentración final 10 µM.
3. Se incubaron a 29 °C durante 24 h. Al término, se congelaron los embriones con N₂ liq. y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

B) Obtención de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Canario 60.

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* se germinaron y crecieron de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Las semillas se desinfectaron con una sol. de etanol al 70%, se agitaron e incubaron a temperatura amb. durante 1 min.
2. Posteriormente se les añadió sol. de hipoclorito de sodio al 1%, se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se decantó y añadieron 300 mL de H₂O bidestilada, se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h.
3. Se colocaron las semillas en un recipiente que contenía agrolita humedecida con H₂O bidestilada, cuidando colocar la parte del hilo de la semilla en contacto con la agrolita. Se incubó a 29 °C durante 5 días (las semillas fueron regadas diariamente con H₂O bidestilada).

Tabla III.- Soluciones utilizadas en la obtención de fracciones subcelulares de los embriones de *Zea mays* y de los tejidos vegetales fotosintéticos (*Nicotiana tabacum* o *Phaseolus vulgaris*).

Amortiguador	Composición de la solución	
	Para embriones de <i>Zea mays</i> raza criolla Chalqueño	Para un tejido vegetal fotosintético (<i>Nicotiana tabacum</i> línea T11 o <i>Phaseolus vulgaris</i> var. Canario 60).
De imbibición	KCl 50 mM, Tris 50 mM, pH 7.6; MgCl ₂ 10 mM y Sacarosa 2%.	-----
De homogenización	Sorbitol 250 mM, HEPES/BTP 50 mM, pH 7.8, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, KCl 1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (complete, Roche) 1.6 µg/mL.	Sorbitol 620 mM, HEPES/BTP 50 mM, pH 7.8, β-Mercaptoetanol 15 mM, ácido ascórbico 5 mM, EDTA 3 mM, DTT 1 mM, KCl 1 mM, PVP 0.6%, BSA 0.2% y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) 1.6 µg/mL.
De resuspensión del botón microsomal y de ajuste de peso	Sorbitol 620 mM, KH ₂ PO ₄ 5 mM, pH 7.8, KCl 5 mM, DTT 1 mM y EDTA 0.1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (complete, Roche) 1.6 µg/mL.	Sorbitol 620 mM, KH ₂ PO ₄ 5 mM, pH 7.8, KCl 3.5 mM, DTT 1 mM y EDTA 0.1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) 1.6 µg/mL.
De lavado	Sorbitol 350 mM, HEPES/MES 2 mM, pH 7.8, DTT 1 mM y KCl 1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (complete, Roche) 1.6 µg/mL.	Sorbitol 350 mM, HEPES/MES 2 mM, pH 7.8, DTT 1 mM y KCl 1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) 1.6 µg/mL.

4. Una vez que las semillas exhibieron un crecimiento de la radícula aprox. de 3 cm. de longitud, fueron transplantadas a vasos contenedores provistos con agrolita humedecida y se colocaron en el invernadero.

5. Las plantas fueron crecidas en invernadero con fotoperíodo natural y se regaron alternando diariamente los riegos con agua y con medio Hoagland hasta alcanzar una edad de aprox. 2 meses con una altura de aprox. 40 cm. y la presentación de 3 a 5 trifolios.

El medio Hoagland para el riego de las plantas de frijol se preparó aforando 100 mL de solución de macronutrientes, más 10 mL de solución de micronutrientes, más 1 mL de solución Fe EDTA 0.5% a 1 L ajustando el pH entre 5.2-5.5 con NaOH al 8%. Las soluciones fueron elaboradas de la siguiente manera:

- Solución de macronutrientes: KNO₃ 60 mM; Ca(NO₃)₂ H₂O 40 mM; MgSO₄ 7H₂O 20 mM y NH₄H₂PO₄ 10 mM pH de la solución 3.0.
- Solución de micronutrientes: H₃BO₃ 4.6 mM; MnCl₂ 4H₂O 0.9 mM; ZnSO₄ 7H₂O 0.08 mM; CuSO₄ 5H₂O 0.03 mM y H₂MoO₄ H₂O 0.01 mM pH de la solución 4.4.
- Solución al 0.5% de Fe EDTA pH de la solución 3.0.

Una vez que se tuvieron plantas adultas, se realizó la aplicación de la toxina utilizando para ello una jeringa sin aguja e introduciendo 20 μL de una solución de FB_1 cuya concentración fue de 10 μM en cada aplicación, realizándose aproximadamente 6 aplicaciones por hoja, con un tiempo de exposición de 24 h. Al mismo tiempo, se realizó la aplicación en hojas control, a las cuales se les aplicó agua estéril en vez de la toxina.

C) Obtención de plantas de *Nicotiana tabacum* línea T11.

Aproximadamente 100 semillas fueron germinadas en un recipiente que contenía una mezcla de tierra de hoja, Metromix 200 y vermiculita en una relación 2:1:1 (p:p:p). El almácigo fue crecido en invernadero con fotoperíodo natural y se regó cada tercer día hasta que las plántulas alcanzaron un tamaño de aproximadamente 5 cm. Posteriormente se transfirieron las plántulas del almácigo a macetas que contenían la mezcla de tierra de hoja, Metromix 200 y vermiculita en una relación 2:1:1 (p:p:p) colocando 3 plántulas por maceta. Las plantas fueron crecidas en invernadero con fotoperíodo natural y se regaron cada tercer día con agua hasta alcanzar una edad de aprox. 2 meses con una altura de aprox. 70 cm.

D) Recolección de las hojas de los dos tejidos vegetales fotosintéticos.

1. Se usaron guantes de plástico en todo el proceso.
2. Se seleccionaron las plantas que serían utilizadas para la recolección de las hojas, escogiéndose las hojas que eran de mayor tamaño y de color verde (de aspecto saludable) o en su caso aquellas plantas cuyas hojas fueron infiltradas.

Se limpió cada una de las hojas rociando agua bidestilada en la parte superior e inferior de la hoja, utilizando una pizeta y limpiándose con una toalla de papel.

Posteriormente, se cortó la hoja con tijeras y se envolvió con un cuadro de papel aluminio; en el caso de las hojas con aplicación, sólo se cortó alrededor de la zona de la hoja que fue aplicado el tratamiento. Se congeló la hoja envuelta sumergiéndose en un termo con nitrógeno líquido. Esto se repitió hasta que se terminó con todas las hojas de interés de la planta correspondiente.

3. Finalmente todas las hojas congeladas se colocaron en una bolsa de plástico que fue previamente etiquetada y se almacenaron a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

II. Aislamiento y purificación de vesículas de membrana plasmática (VMP) de los diferentes tejidos vegetales.

Una vez que fueron obtenidas las muestras biológicas correspondientes a cada especie vegetal se realizó la obtención de la fracción microsomal de cada una según Packer y Douce (1987).

A) Obtención de la fracción microsomal de los embriones de semillas de *Zea mays* (raza criolla Chalqueño).

La obtención de la fracción microsomal de los embriones de *Zea mays* se llevó a cabo de acuerdo al esquema de la Figura 8.

B) Obtención de la fracción microsomal de hojas de *P. vulgaris* y de *N. tabacum*.

La obtención de la fracción microsomal de ambas especies vegetales se realizó de acuerdo al procedimiento de la Figura 9.

Las soluciones empleadas para la obtención de fracciones subcelulares de embriones de *Zea mays* y de un tejido vegetal fotosintético (*Nicotiana tabacum* o *Phaseolus vulgaris*) se muestra en la Tabla III.

Para la preparación de los diferentes medios utilizados en la obtención de fracciones subcelulares se usaron las siguientes soluciones concentradas:

- HEPES 500 mM ajustado a pH de 7.8 con BTP.
- HEPES 500 mM ajustado a pH de 7.8 con MES.
- DTT 300 mM
- KH_2PO_4 200 mM ajustado a pH 7.8 con KOH
- EDTA 100 mM ajustado a pH 7.8 con KOH
- KCl 50 mM

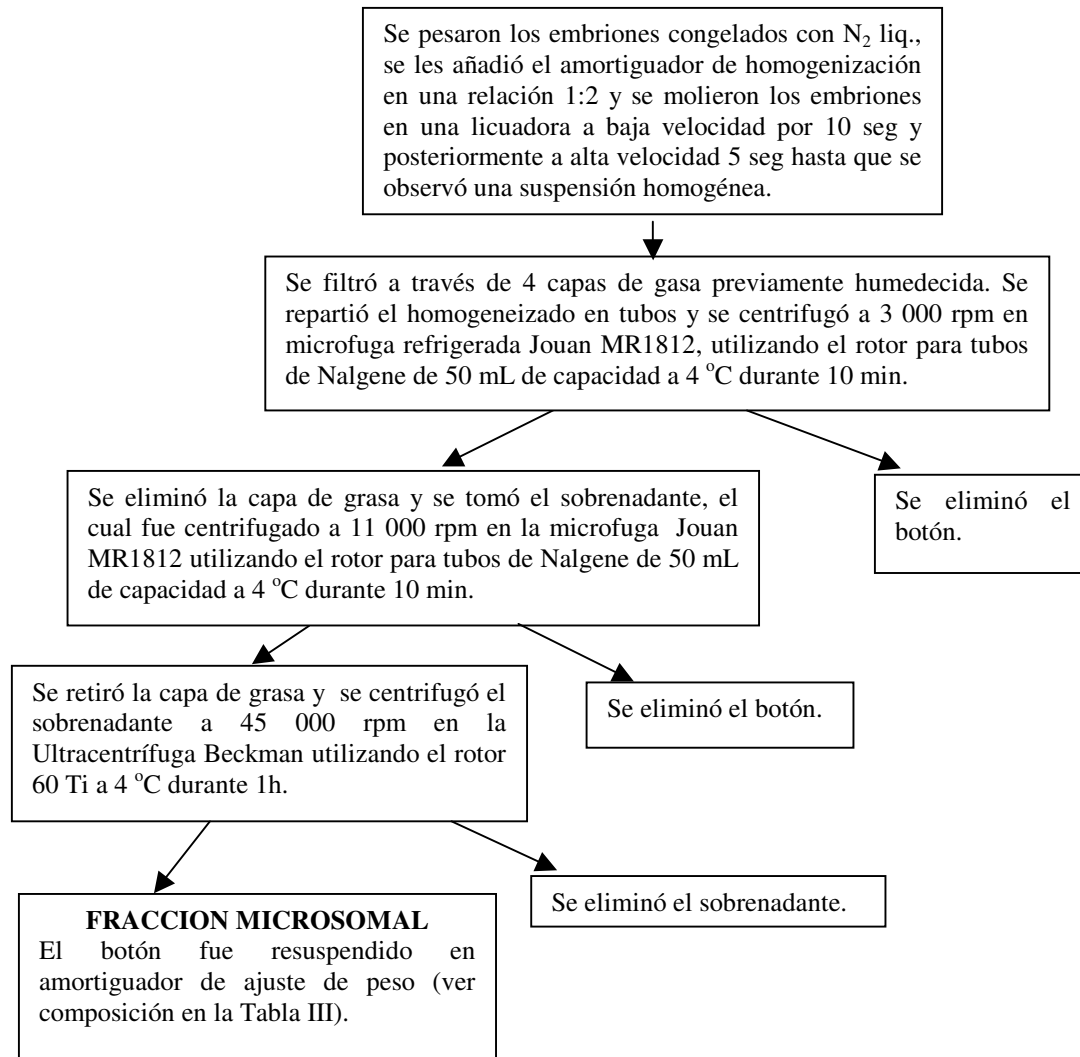


Figura 8. Procedimiento de obtención de la fracción microsomal de embriones de *Zea mays*.

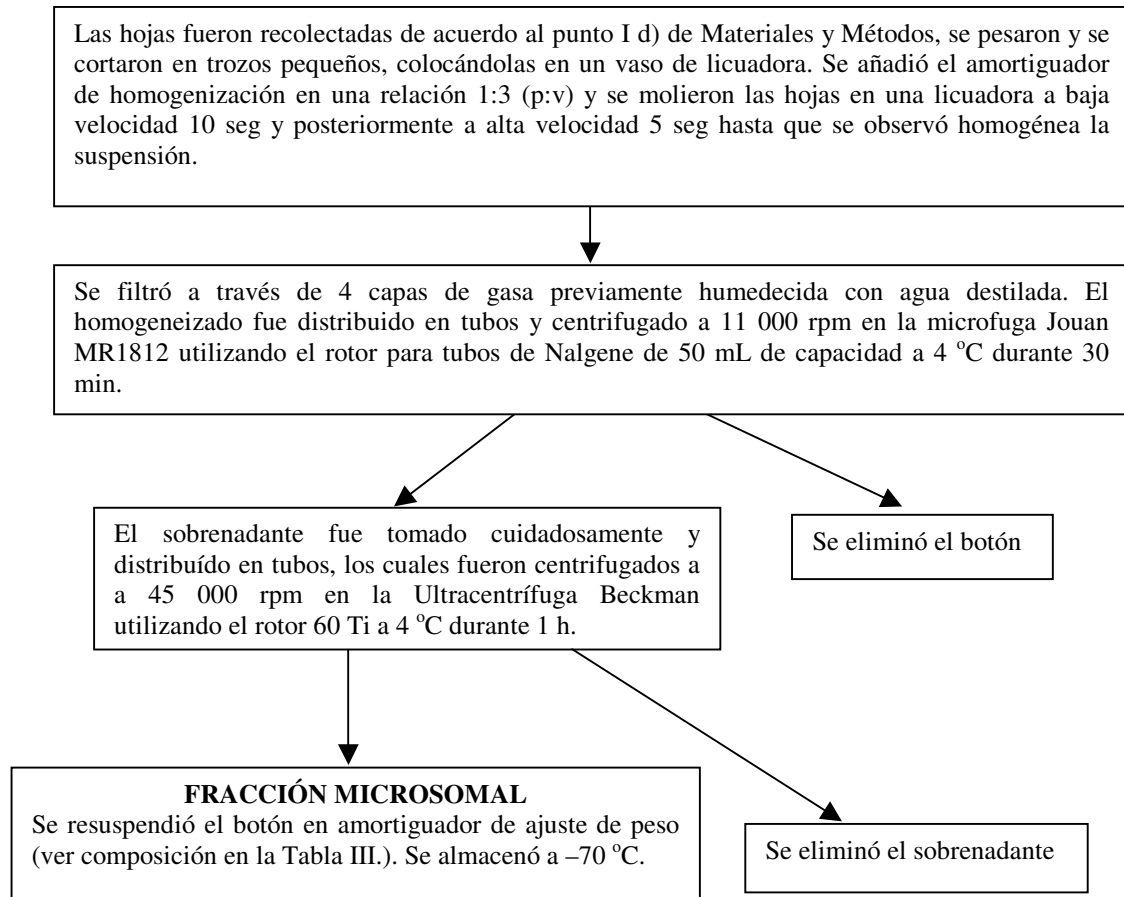


Figura 9. Procedimiento de obtención de la fracción microsomal de hojas de *P. vulgaris* y de *N. tabacum*.

C) Obtención de VMP de los diferentes tejidos vegetales.

Después de obtener la fracción microsomal se hizo la determinación de la concentración de proteína según el método descrito en el punto III de Materiales y Métodos, para continuar con la obtención de la preparación enriquecida en vesículas de membrana plasmática (VMP), y que se describe a continuación. Primero se preparó una mezcla de fases (MF) y luego un sistema de fases (SF) como se indica en la Tabla IV de acuerdo al método de Packer y Douce (1987) y al establecido en nuestro laboratorio por Sánchez-Nieto *et al.* (1997).

Se adicionaron 10 mg y 0.8 mg de proteína microsomal de embriones de *Zea mays* y del tejido vegetal fotosintético (*Nicotiana tabacum* o *Phaseolus vulgaris*) respectivamente, a una mezcla de fases de 3 g de peso, preparada como se indicó en la Tabla IV. Se añadió amortiguador de ajuste de peso (Tabla III), según el tipo de tejido, para alcanzar un peso de 4 g (peso total que da la MF y las membranas), se mezcló por inversión alrededor de 25 veces y se centrifugó a 4 000 rpm a 4 °C durante 20 min en una microfuga Jouan MR1812 utilizando el rotor para tubos de Nalgene de 50 mL de capacidad. Se recuperó la fase superior (Fracción U1) y se añadió a la fase de dextrán de un SF de 4 g en el cual se ajustó el peso con agua y no con la adición de membranas. Se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C durante 20 min y se recuperó la fase superior (Fracción U2) llegando hasta este paso de purificación para el caso de los embriones de maíz. Para el caso de las hojas de frijol y de tabaco se realizó un paso adicional hasta la obtención de la fracción U3. Este procedimiento se ilustra en el diagrama de la Figura 10.

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

REACTIVOS	Mezcla de fases (MF)	
	Para embriones de <i>Zea mays</i>	Para hojas de <i>Phaseolus vulgaris</i> y de <i>Nicotiana tabacum</i> .
Dextrán T500 20%	6.5%	6.2%
Polietilenglicol (PEG) 40%	6.5%	6.2%
Sorbitol	620 mM	620 Mm
KH ₂ PO ₄ 200 mM, pH 7.8	5 mM	5 mM
KCl 50 Mm	5 mM	3.5 mM
DTT 300 mM	1 mM	1 mM
EDTA 100 mM	0.1 mM	0.1 mM

Se colectó la fracción U2 para el caso de embriones de maíz y la fracción U3 para las hojas de frijol o de tabaco y se diluyó usando una relación de 2 volúmenes de amortiguador de lavado por una de U2 o U3; se mezcló bien y se centrifugó a 45 000 rpm en la Ultracentrífuga Beckman utilizando el rotor 60 Ti a 4 °C durante 1.5 h. El botón obtenido se resuspendió en un

volumen pequeño de amortiguador de lavado añadiéndoles cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se le realizó la determinación de la concentración de proteína y finalmente se almacenó en alícuotas de 50 μL a -70°C .

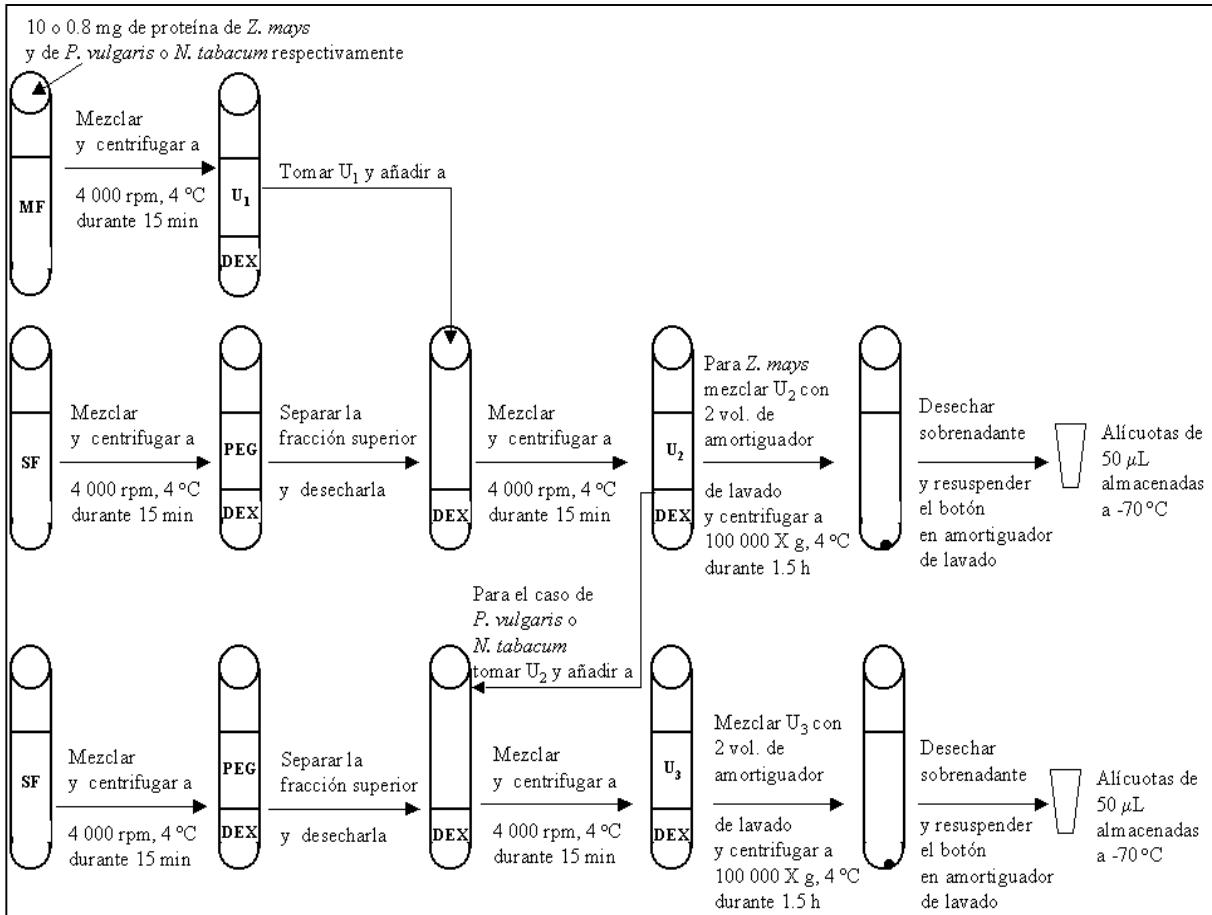


Figura 10. Diagrama que ilustra el procedimiento de purificación de las VMP a partir de diferentes tejidos vegetales.

III. Determinación de proteína.

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

IV. Obtención de membranas resistentes a la solubilización por detergente (DRM) a partir de VMP.

Una vez que se realizó el aislamiento y purificación de las vesículas de membrana plasmática se hizo la obtención de membranas resistentes a la solubilización por detergente Tritón X-100. Para ello se realizó una combinación de los métodos descritos para tabaco (Peskan *et al.*, 2000) y levadura (Bagnat *et al.*, 2000), la cual consistió en lo siguiente:

1. A 250 μg de vesículas de membrana plasmática que fueron resuspendidas en amortiguador TNE (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM) obtenidas del tejido vegetal, se les añadió Tritón X-100 (TX100) a una concentración final de 1%, y las membranas fueron solubilizadas a 4 °C durante 30 min.
2. Una vez solubilizadas las membranas, se les añadió 0.5 mL de Optiprep (Axis-Shield) al 60% para obtener una concentración final de 40%.
3. Al tubo anterior se le adicionaron 1.2 mL de solución Optiprep al 30% en TXNE (TNE, 0.1% TX100).
4. Se adicionó enseguida 0.2 mL de solución TXNE.
5. Se centrifugó a 45 000 rpm en la Ultracentrífuga Beckman utilizando el rotor SW50.1 a 4 °C durante 2 h.
6. El gradiente fue dividido en 6 fracciones de igual volumen (358 μL cada fracción). La fracción superior corresponde a la fracción de DRM.
7. La fracción DRM (358 μL) se lavó con amortiguador TNE con objeto de remover el Optiprep residual, para lo cual se centrifugó en la Ultracentrífuga Optima TL-100 utilizando el rotor TLA 100.4 a 4 °C durante 1.5 h.
8. El botón obtenido fue resuspendido en amortiguador TNE y se le adicionó cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
9. La muestra se guardó a -70 °C.

Este procedimiento se muestra en el diagrama de la Figura 11.

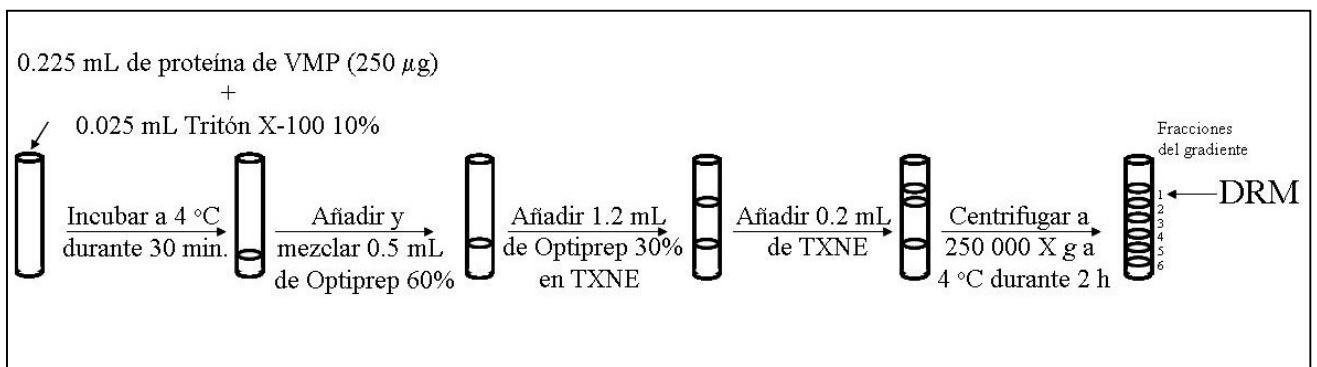


Figura 11. Procedimiento de obtención de membranas resistentes a la solubilización por detergente (DRM). Donde VMP, vesículas de membrana plasmática; TXNE, Amortiguador TNE y 0.1% Tritón X-100.

V. Microscopía electrónica.

Para llevar a cabo la obtención de las micrografías electrónicas tanto de VMP como de DRM se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se centrifugaron las muestras de VMP obtenidas del tejido vegetal y de DRM obtenidas del gradiente de Optiprep a una velocidad de 100 000 X g. Los botones obtenidos fueron cubiertos con glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.4 a 4 °C durante 2 h.
2. Se enjuagaron las muestras y se les añadió tetróxido de osmio al 1% a 4 °C durante 2 h.
3. Las muestras fueron deshidratadas.
4. Se realizó una infiltración con óxido de propileno y se incubaron por un período entre 24-36 h.
5. Las muestras se embebieron en epon a 60 °C durante 48 h.
6. Se realizaron ultracortes de 100 nm de grosor en el Ultramicrotomo Reicher, los cuales fueron recolectados en rejillas de cobre con una malla de tamaño 200.
7. Las muestras se tiñeron con acetato de uranilo y se observaron en el microscopio electrónico Jeol 1200 EXII a 60 kV.

VI. Determinación de hidrólisis de ATP.

La medición de la actividad de enzimas marcadoras (ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, ATPasa mitocondrial, ATPasa de tonoplasto) y de probables contaminantes como fosfatasas, se hizo midiendo el efecto de inhibidores en el ensayo de hidrólisis de ATP medido como la liberación de ortofosfato del nucleótido trifosfatado como se describe en González-Romo *et al.* (1992).

La mezcla de reacción de 150 µL presentó la siguiente composición (todo el material utilizado en este ensayo fue lavado con un detergente libre de fosfatos, Extran y tratado con ácido sulfúrico):

Sacarosa 250 mM, PIPES 20 mM ajustado a pH 6 con NaOH, ATP 10 mM ajustado a pH 6 con PIPES, MgCl₂ 10 mM y Carbonilcianida-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) 7 µM, partiéndose de las siguientes soluciones concentradas:

PIPES 500 mM ajustado a pH 6 con NaOH, ATP 300 mM ajustado a pH 6 con PIPES, MgCl₂ 300 mM y CCCP 1 mM en Etanol.

Los inhibidores empleados en este ensayo fueron los siguientes (se indican las concentraciones finales en el ensayo):

- a) Ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) 200 μM , como inhibidor de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.
- b) Azida de sodio (NaN_3) 2 mM, como inhibidor de la ATPasa de la mitocondria.
- c) Nitrato de potasio (KNO_3) 50 mM, como inhibidor de la ATPasa del tonoplasto.
- d) Molibdato de amonio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 2 mM, como inhibidor de fosfatasa.

La reacción comenzó con la adición de 5 μg de proteína membranal de la fracción microsomal o de la membrana plasmática (U_2 para *Zea mays* y U_3 para el caso de *Phaseolus vulgaris* y *Nicotiana tabacum*), incubando el tubo de reacción a 29 °C durante 30 min para el caso de las muestras de *Zea mays* y 20 min para *Phaseolus vulgaris* y *Nicotiana tabacum*. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción fue detenida con la adición de 150 μL de SDS 24%. La reacción de hidrólisis en estas condiciones fue lineal hasta 1 h para *Zea mays* y para *Phaseolus vulgaris* y *Nicotiana tabacum* fue hasta 0.75 h.

La liberación de ortofosfato se determinó por el método colorimétrico que se describe a continuación (González-Romo *et al.*, 1992):

1. Se le añadió a cada tubo 300 μL del reactivo BC, se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
2. Posteriormente se le adicionó a cada tubo 450 μL de la solución E, se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min.
3. Se hizo la lectura de la absorbencia a 850 nm.

La composición de las soluciones empleadas para la determinación de Pi fue la siguiente:

- Solución BC: Consistió de la solución B (Ácido ascórbico al 12% en HCl 1 N) y la C (Molibdato de amonio al 2% en HCl 1 N) en una relación de 1:1 (v/v), se debe añadir la solución B a la C, la mezcla presentó un color ámbar intenso.
- Solución E: Citrato de sodio al 2%, metaarsenito de sodio al 2% y ácido acético al 2%.

Para poder determinar la cantidad de fosfato inorgánico liberado se preparó una curva patrón con K_2HPO_4 (utilizando una solución patrón de 1 mM), la cual se preparó como se ilustra en la siguiente Tabla:

Tubo	Cantidad	K ₂ HPO ₄ (μL)	H ₂ O (μL)	SDS 24%	Sol. BC (μL)	Sol. E (μL)
1	Bco.	----	150	150	300	450
2	Bco.	----	150	150	300	450
3	10 nmoles	10	140	150	300	450
4	20 nmoles	20	130	150	300	450
5	30 nmoles	30	120	150	300	450
6	40 nmoles	40	110	150	300	450
7	60 nmoles	60	90	150	300	450
8	80 nmoles	80	70	150	300	450

VII. Determinación de la actividad de la Glucan sintasa II.

La determinación de la actividad de esta enzima, considerada como una proteína marcadora de la membrana plasmática fue medida por la incorporación de glucosa proveniente de UDPG-glucosa en 1,3-β-poliglucana de acuerdo al método descrito por Sánchez-Nieto *et al.* (1997) con algunas modificaciones. Se preparó el medio de reacción cuya composición fue de Tris-HCl 50 mM, pH 7.0, sacarosa 330 mM, digitonina 0.02%, glicerol 16%, DTT 2 mM, espermita 2 mM, celobiosa 20 mM, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, EGTA 4 mM, UDPG-glucosa 2 mM y 1 μL de UDPG-(¹⁴C) glucosa (0.02 μCi) en un volumen final de 100 μL. La reacción comenzó cuando se añadió 40 μg de proteína de fracción microsomal o de VMP, se incubó a 25 °C durante 30 min. La reacción se detuvo con la adición de UDPG-glucosa 2 mM en etanol al 70% (350 μL por tubo) y se incubó a 4 °C durante 30 min y posteriormente se dejó a -20 °C durante toda la noche. El precipitado formado en cada tubo se colocó sobre círculos de papel Whatman 3 MM. Los filtros se dejaron secar a temperatura ambiente posteriormente se lavaron 2 veces con acetato de amonio 0.5 M en etanol al 30% pH 3.6 preparada al momento. Se secaron los filtros y se transfirieron a un tubo que contenía 4 mL de líquido de centelleo (PPO-Tolueno 5 g/L). Las muestras se contaron cada minuto en un contador de centelleo monocanal LS6500 (Beckman Coulter) utilizando el programa de carbono.

VIII. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.

Se prepararon los geles de acrilamida-bisacrilamida (10%, 0.3%) de 1 mm de grosor (Schägger y von Jagow, 1987) para poder determinar el patrón de las proteínas de vesículas de membrana plasmática y de DRM obtenidas de las diferentes especies vegetales que se utilizaron en el presente trabajo de tesis.

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

Tabla V.- Composición de los geles de poliacrilamida-SDS (Schägger y Von Jagow, 1987).

Reactivos	Gel separador (μL)	Gel concentrador (μL)
Acrilamida-Bis-acrilamida (30%-0.398%)	1632	225
Amortiguador del gel TRIS/SDS pH 8.9	1632	421
Glicerol	660	
H ₂ O bidestilada	991	1038
Persulfato de amonio 10%*	16.5	14.0
TEMED*	1.65	1.4
Cantidad total (μL)	4933.15	1700.0

* Una vez añadidos, el manejo de la solución debe ser muy rápido.

Las soluciones utilizadas para la preparación de los geles de poliacrilamida-SDS y el corrimiento electroforético se muestran 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%

Sin ajustar el pH.

d) Amortiguador del ánodo:

Tris 0.2 M

Ajustar pH 8.9-9.0/HCl

e) Amortiguador de digestión:

SDS 10%

Tris 100mM pH 6.8

Azul de bromofenol 0.6%

β -mercaptoetanol 4%

f) Solución de marcadores de peso molecular:

Se utilizó un estándar de proteínas con diferente peso molecular. El estándar utilizado fue el de GIBCO BRL (No. cat. 10748-010), compuesto por las siguientes proteínas:

Proteína (N ^o banda)	Peso molecular (kDa)
1.....	172.6
2.....	111.4
3.....	79.6
4.....	61.3
5.....	49.0
6.....	36.4
7.....	24.7
8.....	19.2
9.....	13.1
10.....	9.3

Con los reactivos preparados se procedió de la siguiente manera:

1. Se utilizó el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad de electroforesis para minigeles. Se ensamblaron las placas de vidrio con su separador de 1 mm en cada soporte, sellando los extremos inferiores con vaselina e insertándose a su vez en el aditamento incluido en el sistema, en el cual se montaron dos soportes, y entonces se hizo la prueba de fuga con agua bidestilada.
2. Cuando no hubo fugas, se procedió a quitar el exceso de agua y se preparó el gel separador como ya se mencionó y se vació entre las dos placas de vidrio, añadiéndose aproximadamente 1 mL de una solución SDS 0.3% para evitar la formación del menisco. Se dejó polimerizar entre 25-30 min. Se trabajó en una superficie que fue nivelada.
3. Se removió la solución SDS 0.3%, se preparó el gel concentrador, que fue vertido entre las placas de vidrio, introduciéndose enseguida el peine de 10 carriles y permitiéndose la polimerización por 30 min.
4. Se retiró el peine muy despacio y se limpió el exceso de solución que no polimerizó, se llenaron los pozos con el amortiguador del cátodo y se marcó cada soporte con el nombre del tipo de muestra que se cargaría.
5. Se montaron los soportes en la cámara y se hizo el cargado de las muestras que fueron incubadas con amortiguador de digestión, en una relación 1/2 (v/v) y cuya composición ya se indicó a temperatura ambiente durante 15 min.
6. Se corrió la electroforesis de las muestras a 60 V una hora y después a 90 V hasta que salió del gel todo el azul de bromofenol.

7. Al término de la electroforesis se desmontaron los soportes, se sacaron los geles de cada uno de éstos y se colocaron en un recipiente marcado con su nombre respectivo, el cual contenía la solución fijadora para la tinción del gel correspondiente de acuerdo al método descrito en Carmona (2003) o bien amortiguador de transferencia.

IX. Inmunoréplica contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

Una vez que se llevó a cabo la separación de las proteínas de VMP o de DRM de las diferentes especies de plantas, se procedió a realizar la transferencia de las mismas a membranas de polivinildifluoruro (PVDF) (Immobilon Millipore) como sigue:

1. Terminada la electroforesis, los geles fueron incubados a temp. amb. con agitación suave durante 15 min en amortiguador de transferencia (NaPO₄ 15 mM, pH 6.8, SDS 0.05% y metanol absoluto 20%).
2. Se recortó una membrana de polivinildifluoruro (PVDF) de 0.4 µm, la cual se sumergió en metanol absoluto.
3. Se ensambló el sistema siguiente, acomodando desde abajo hacia arriba: una esponja, una hoja de papel filtro, el gel, la membrana de PVDF, una hoja de papel filtro y una esponja, todos previamente saturados con el amortiguador de transferencia.
4. El conjunto anterior se colocó en la cámara de transferencia orientándolo de manera que el gel se encontró de cara hacia el cátodo (negativo, negro) y la membrana hacia el ánodo (positivo, rojo). Se cuidó que la cámara tuviese suficiente amortiguador de transferencia y un agitador en el fondo.
5. La transferencia se realizó a 25 V, a temperatura ambiente sin reflujo de agua durante 2.2 h.
6. Transcurrido el tiempo de corrida, se apagó la fuente de poder y se removió el sistema ensamblado, para lo cual se abrió cuidadosamente y la membrana de PVDF se colocó con la cara que estuvo en contacto con el gel hacia arriba en un recipiente que contenía TTBS (Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM y 0.1% Tween 20) a temperatura ambiente con agitación suave durante 5 min.
7. Se removió la solución TTBS y se repitió la operación. Transcurridos los 5 min se decantó la sol. de TTBS y se añadió sol. TBS (Tris 20 mM y NaCl 150 mM), incubándose otros 5 min.
8. La membrana se incubó con solución bloqueadora (leche descremada al 5% en TBS) a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 h.

9. Una vez transcurrido el tiempo se hicieron dos lavados con TTBS de 5 min cada uno y posteriormente un lavado con TBS durante 5 min.

10. La membrana se incubó con el anticuerpo primario, para lo cual se utilizó un anticuerpo específico, que fue el anticuerpo contra la ATPasa de H^+ de membrana plasmática a una dilución de 1:4000.

La dilución del anticuerpo se realizó con leche descremada al 2% en TBS y se incubó la membrana a 4 °C en bolsa de plástico durante toda la noche.

11. Al día siguiente la membrana se removi6 de la bolsa de plástico y se lav6 dos veces con TTBS (5 min cada lavado) y posteriormente se hizo un lavado con TBS.

12. La membrana se incub6 con el segundo anticuerpo, para lo cual se utilizaron dos diferentes anticuerpos:

- i) Fosfatasa alcalina.- Se utiliz6 una diluci6n de 1:1000 con leche descremada 5% a temperatura ambiente sin agitaci6n durante 2 h.
- ii) Peroxidasa.- Se utiliz6 una diluci6n 1:5000 con leche descremada 5% en TBS a 4 °C durante 30 min.

13. Se repitieron los pasos indicados en el punto 11.

14. Se llev6 a cabo el revelado de las membranas por cualquiera de las dos t6cnicas siguientes:

- a) Fosfatasa alcalina.- Se coloc6 la membrana con la soluci6n reveladora (100 μ L NBT , 100 μ L BCIP, 10 mL Amortiguador de carbonato) a temperatura ambiente en agitaci6n hasta que apareci6 la banda de inter6s.
- b) Peroxidasa.- Para el revelado se utiliz6 el paquete para Luminiscencia ECL de Amersham Biosciences.

IX. An6lisis de bases esfingoideas o de cadena larga y de ceramidas por cromatograf6a en capa fina (TLC).

Una vez obtenidas las VMP o los DRM de los diferentes tejidos vegetales, el an6lisis de bases esfingoideas o de cadena larga y de ceramida se realiz6 de acuerdo al m6todo descrito por Castegnaro *et al.*, 1998.

A) Obtenci6n del extracto lip6dico.

1. Las VMP o DRM (300 μ g de prote6na en 100 μ L) fueron a6adidas a un tubo que conten6a KOH 8.9 mM, KCl 1.07 mM y acetato de etilo 71%. Fueron agitadas vigorosamente durante 1

min y posteriormente fueron incubadas a temperatura ambiente en agitación constante durante 40 min.

2. Transcurrido el tiempo se recuperó la fase orgánica o el extracto lipídico.

3. La fase orgánica fue evaporada con N₂ gas.

4. El residuo fue resuspendido con 50 µL de etanol absoluto.

B) Aplicación en placas de TLC.

Se utilizaron dos tipos de placas para separación de lípidos por cromatografía en capa fina. Para la detección de bases de cadena larga se utilizaron placas de plástico (silica gel 60 F₂₅₄ Merck) y placas de aluminio (silica gel 60 F₂₃₄ Merck), una fase móvil consistente en CHCl₃/MeOH/NH₄OH 2 N en una relación (40/10/1) y reveladas con NaCl/Brillant Blue R/MeOH o con primulina 0.1%.

Para la separación de ceramidas se emplearon placas de aluminio (silica gel 60 F₂₅₄ Merck) utilizando como fase móvil CHCl₃/MeOH/CH₃COOH en una relación (94/1/5) basado en Ji *et al.* (1995) y el revelado se llevó a cabo con CuSO₄·H₃PO₄ o con primulina 0.1%.

RESULTADOS

Se ha demostrado la existencia de balsas lipídicas en células animales y de levaduras basándose en su insolubilidad en detergentes no-iónicos como el Tritón X-100 a una baja temperatura y utilizando otros criterios como técnicas de fluorescencia. En el caso de plantas se han detectado dominios membranales en algunas especies como *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana* (Mongrand *et al.*, 2004; Shaollari *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005) a través de aislar fracciones de membrana plasmática resistentes a la solubilización por detergente (DRM). En todos los casos los DRM han demostrado que tienen una composición de proteínas y lípidos diferente a la del resto de la membrana plasmática. En el presente trabajo uno de los objetivos fue demostrar que existen similarmente fracciones de DRM en la membrana plasmática de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris*, especies en las que no ha sido investigado la presencia de DRM. Para ello, se utilizaron hojas de *Nicotiana tabacum* (línea T11) como modelo para estandarizar la obtención de membranas resistentes a detergente (DRM). Los embriones de *Zea mays* (variedad criolla Chalqueño) como un modelo experimental establecido en nuestro laboratorio para modificar la biosíntesis de esfingolípidos, y hojas de *Phaseolus vulgaris* (variedad Canario 60) como una especie similar a la de referencia (*Nicotiana tabacum*), pero que es sensible a la acción de la FB₁. Esto con la finalidad de contar con un criterio adicional para demostrar la presencia de balsas lipídicas en la membrana plasmática de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris*.

I. Purificación de VMP de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*.

Ya que el objetivo de este trabajo era aislar DRM de la membrana plasmática, lo primero que se realizó fue la obtención de membranas plasmáticas con alta pureza, para lo cual se estandarizaron condiciones que llevaron a obtener fracciones de membrana plasmática de embriones de *Zea mays*, de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*, que se analizaron de acuerdo a tres parámetros: determinación de la actividad de enzimas marcadoras, detección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática y ultraestructura de las fracciones membranales.

A) Determinación de la actividad de enzimas marcadoras.

El primer criterio de pureza de las membranas plasmáticas fue la determinación de la actividad de enzimas marcadoras de las membranas más abundantes en los tejidos estudiados: la plasmática, la del tonoplasto y la mitocondrial. Por ello se midió la actividad de la ATPasa de H⁺ y de la Glucan sintasa II (GS-II) como marcadores de la membrana plasmática, la

ATPasa de H⁺ de tonoplasto y la ATPasa de H⁺ mitocondrial, usando los inhibidores específicos correspondientes.

La proteína recuperada como membrana plasmática fue similar para los embriones de *Zea mays* y hojas de *Phaseolus vulgaris* (3.8%) con respecto a su fracción microsomal respectiva y fue menor para el caso de las hojas de *Nicotiana tabacum* (3%) (Tabla VI y Fig. 12). Las tres preparaciones presentaron un enriquecimiento de la actividad enzimática de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática que fue de 3 veces para *Zea mays* y de 5 y 7 veces para *Phaseolus vulgaris* y *Nicotiana tabacum* respectivamente, al compararse con las fracciones microsomales respectivas. Considerando los valores correspondientes a la actividad de la GS-II, se encontró una purificación de 2 veces para *Zea mays*, y de 10 y 7 veces para *Phaseolus vulgaris* y *Nicotiana tabacum* respectivamente. Por otro lado, se detectó un enriquecimiento de la actividad de fosfatasa y se obtuvieron bajas actividades para el resto de las enzimas marcadoras evaluadas.

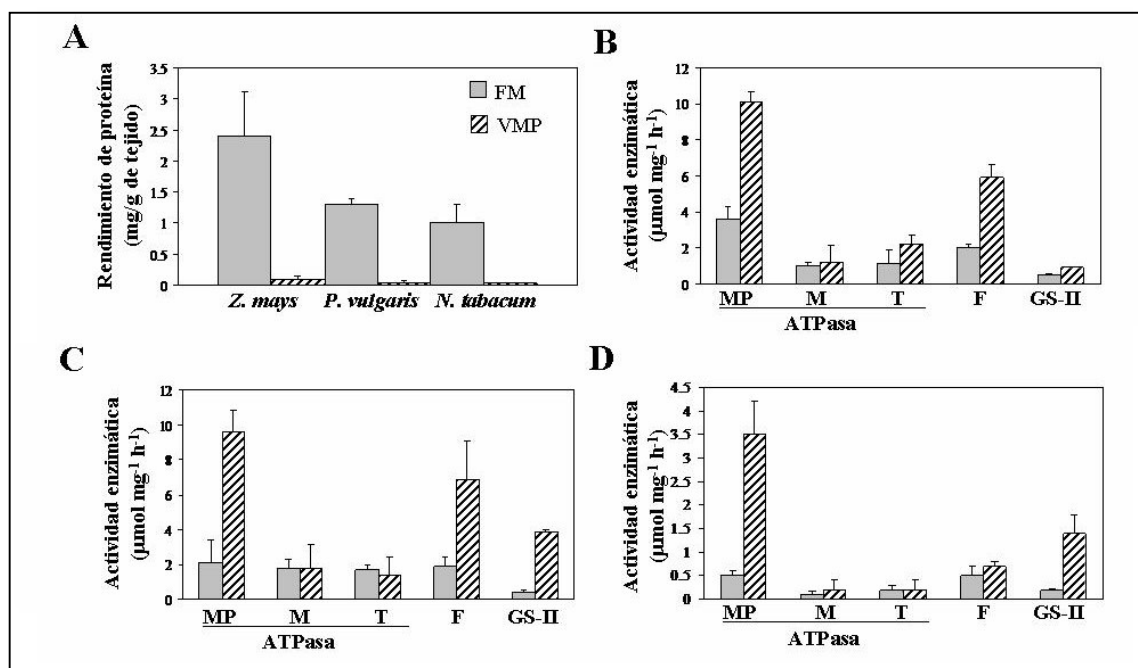


Figura 12.- Purificación de VMP de tres tejidos vegetales diferentes. A, rendimiento de las diferentes fracciones subcelulares: □ fracción microsomal (FM) y ▨ vesículas de membrana plasmática (VMP). B-D, actividades específicas de hidrólisis de ATP de fracciones subcelulares de embriones de *Zea mays*, de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*, respectivamente. El ensayo enzimático fue realizado de acuerdo a lo descrito en el punto VI de Materiales y Métodos, donde MP, es membrana plasmática; M, mitocondria; T, tonoplasto; F, actividad de fosfatasa y GS-II, actividad de Glucan sintasa II. Se muestra la media ± desviación estándar de 6 experimentos independientes.

Tabla VI. Purificación de VMP de tres tejidos vegetales. La obtención de las diferentes fracciones membranales y el ensayo enzimático se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. La inhibición indicada está calculada considerando la hidrólisis de ATP total como 100%. Donde FM, fracción microsomal; VMP, vesículas de membrana plasmática; Inh, inhibición. Se muestra la media \pm desviación estándar de 6 experimentos independientes.

	<i>Zea mays</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>Nicotiana tabacum</i>	
	FM	VMP	FM	VMP	FM	VMP
Rendimiento de proteína (mg/g de tejido)	2.4 \pm 0.7	0.09 \pm 0.05	1.3 \pm 0.1	0.05 \pm 0.02	1.0 \pm 0.3	0.03 \pm 0.02
ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática (\square mol mg ⁻¹ h ⁻¹) (% Inh)	3.6 \pm 0.7 (46 \pm 6)	10.1 \pm 0.6 (59 \pm 1.0)	2.1 \pm 1.3 (56 \pm 12)	9.6 \pm 1.3 (71 \pm 4)	0.5 \pm 0.1 (62 \pm 13)	3.5 \pm 0.7 (61 \pm 8)
ATPasa de H ⁺ de la mitocondria (\square mol mg ⁻¹ h ⁻¹) (% Inh)	1.0 \pm 0.2 (13 \pm 2)	1.2 \pm 0.9 (7 \pm 6)	1.8 \pm 0.5 (38 \pm 8)	1.8 \pm 1.3 (10 \pm 9.7)	0.1 \pm 0.08 (13 \pm 8)	0.2 \pm 0.2 (4 \pm 4)
ATPasa de H ⁺ del tonoplasto (\square mol mg ⁻¹ h ⁻¹) (% Inh)	1.1 \pm 0.8 (14 \pm 9)	2.2 \pm 0.5 (13 \pm 4)	1.7 \pm 0.3 (37 \pm 7)	1.4 \pm 1.0 (10 \pm 9)	0.2 \pm 0.1 (23 \pm 11)	0.2 \pm 0.2 (4 \pm 4)
Fosfatasa (\square mol mg ⁻¹ h ⁻¹) (% Inh)	2.0 \pm 0.2 (25 \pm 3)	5.9 \pm 0.7 (34 \pm 2)	1.9 \pm 0.5 (41 \pm 9)	6.9 \pm 2.2 (51 \pm 14)	0.5 \pm 0.2 (61 \pm 15)	0.7 \pm 0.1 (10 \pm 1)
Glucan sintasa II (\square mol mg ⁻¹ h ⁻¹)	0.5 \pm 0.04	0.9 \pm 0.07	0.4 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1	0.2 \pm 0.03	1.4 \pm 0.4

B. Detección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por inmunoréplica.

Otra manera de estimar el grado de pureza de las preparaciones membranales fue la detección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por inmunoréplica utilizando un anticuerpo específico. Se encontró un enriquecimiento de esta enzima en las fracciones de membrana plasmática comparadas con las fracciones microsomales de los tres tejidos como puede observarse en la Fig. 13. La preparación de embriones de *Zea mays* presentó un enriquecimiento de la ATPasa de H⁺ en la membrana plasmática de 11.4 veces con respecto a su fracción microsomal. A su vez, las preparaciones de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* presentaron un enriquecimiento de la enzima de 2.3 y de 1.6 veces con respecto a las fracciones microsomales respectivas.

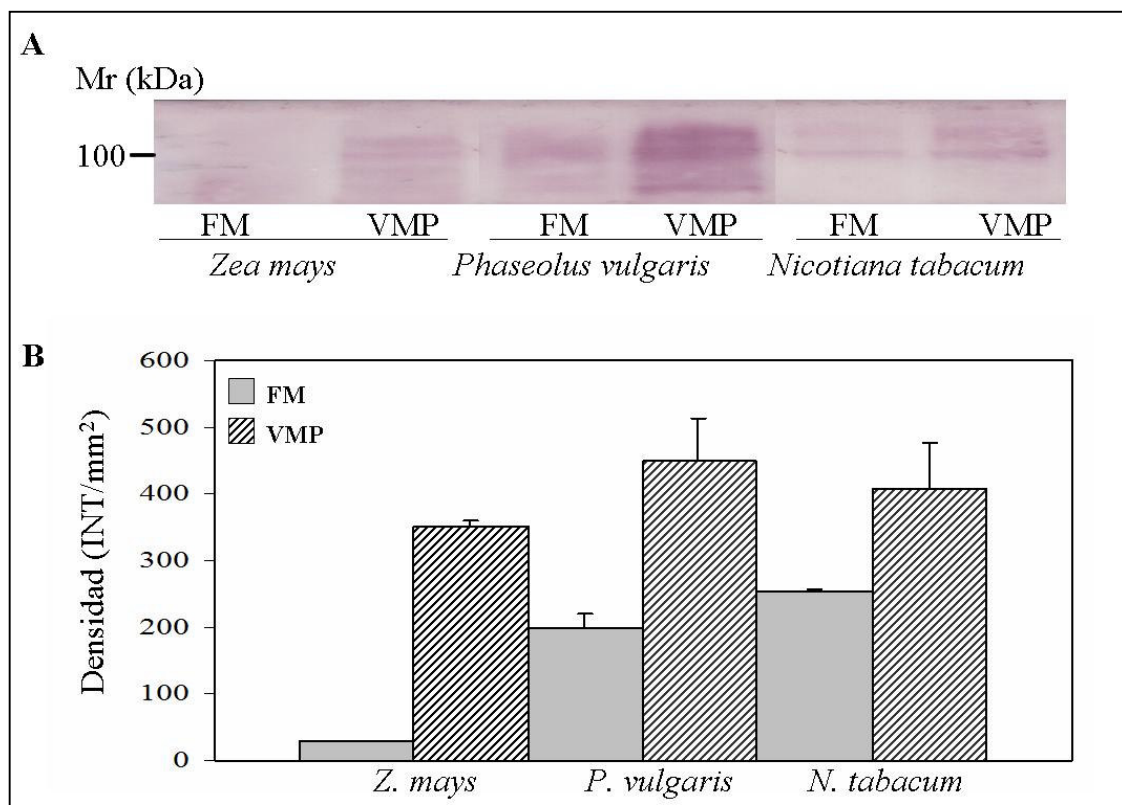


Figura 13.- Determinación de la ATPasa de H⁺ en las fracciones de FM y de VMP. Las membranas plasmáticas fueron purificadas de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Las inmunoréplicas fueron desarrolladas como se describió en Materiales y Métodos utilizando 25 μ g de proteína y el anticuerpo de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. A, detección de la ATPasa de H⁺ en fracciones membranales; B, densitometría de la inmunoréplica de A. FM, fracción microsomal; VMP, vesículas de membrana plasmática; INT, intensidad. El experimento en A es representativo de una serie de 6 experimentos independientes que están considerados en B. Se muestra la media \pm la desviación estándar.

C. Ultraestructura de las fracciones membranales.

La ultraestructura de las vesículas de membrana plasmática obtenidas se determinó por microscopía electrónica de transmisión. Las micrografías electrónicas obtenidas para las

diferentes fracciones membranales de embriones de *Zea mays* se muestran en la Fig. 14A, B; para el caso de hojas de *Phaseolus vulgaris* en la Fig. 15A, B y para *Nicotiana tabacum* en la Fig. 16A, B. Puede observarse en el caso de embriones de *Zea mays*, que su fracción microsomal (Fig. 14A) presentó un patrón de estructuras vesiculares de tamaño variable entre 50-500 nm de diámetro, con material electrodensito amorfo muy abundante; por el contrario, las VMP obtenidas de este tejido (Fig. 14B), mostraron un patrón homogéneo de vesículas de tamaño entre 50-100 nm de diámetro y con ausencia de material electrodensito. Por otro lado, las fracciones microsomas de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* (Figs. 15A y 16A), mostraron estructuras heterogéneas con un tamaño entre 50-500 nm, presentando algunas formas vesiculares y otras de apariencia amorfa; en el caso de *Nicotiana tabacum*, se observó además la presencia de material electrodensito muy abundante.

Las VMP de *Phaseolus vulgaris* (Fig. 15B) presentaron un enriquecimiento de estructuras vesiculares de forma y tamaño homogéneo entre 100-150 nm de diámetro cuyo patrón es muy similar al presentado por las VMP de embriones de *Zea mays* (Fig. 14B). En cambio, las hojas de *Nicotiana tabacum* (Fig. 16B) presentaron un patrón de ultraestructuras vesiculares de forma homogénea, pero de tamaño variable entre 50-500 nm de diámetro, esta fracción membranal mostró acumulación de material electrodensito, aunque no tan abundante como su fracción microsomal.

II. Obtención de membranas resistentes a la solubilización con detergente Tritón X-100 (DRMs) a partir de VMP de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*.

Para poder determinar la existencia de membranas resistentes a la solubilización con detergente a partir de nuestras preparaciones microsomas o de VMP aisladas de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*, fue necesario apoyarnos en diferentes técnicas, ya que no se conoce un parámetro absoluto que determine la presencia de estas regiones membranales. Por ello nos basamos en tres criterios: insolubilidad en Tritón X-100 a 4 °C, ultraestructura y detección de la ATPasa de H⁺, que puede considerarse como una enzima residente de microdominios.

Primeramente, se utilizaron fracciones microsomas de hojas de *Nicotiana tabacum* con la finalidad de poder comenzar a establecer la metodología, utilizando para ello 9 mg de fracción microsomal, la fracción de DRM obtenida fue analizada de acuerdo a su insolubilidad en Tritón X-100 y a su ultraestructura. Posteriormente, esta misma condición fue aplicada para hojas de *Phaseolus vulgaris* (Fig. 17, ver siguiente sección).

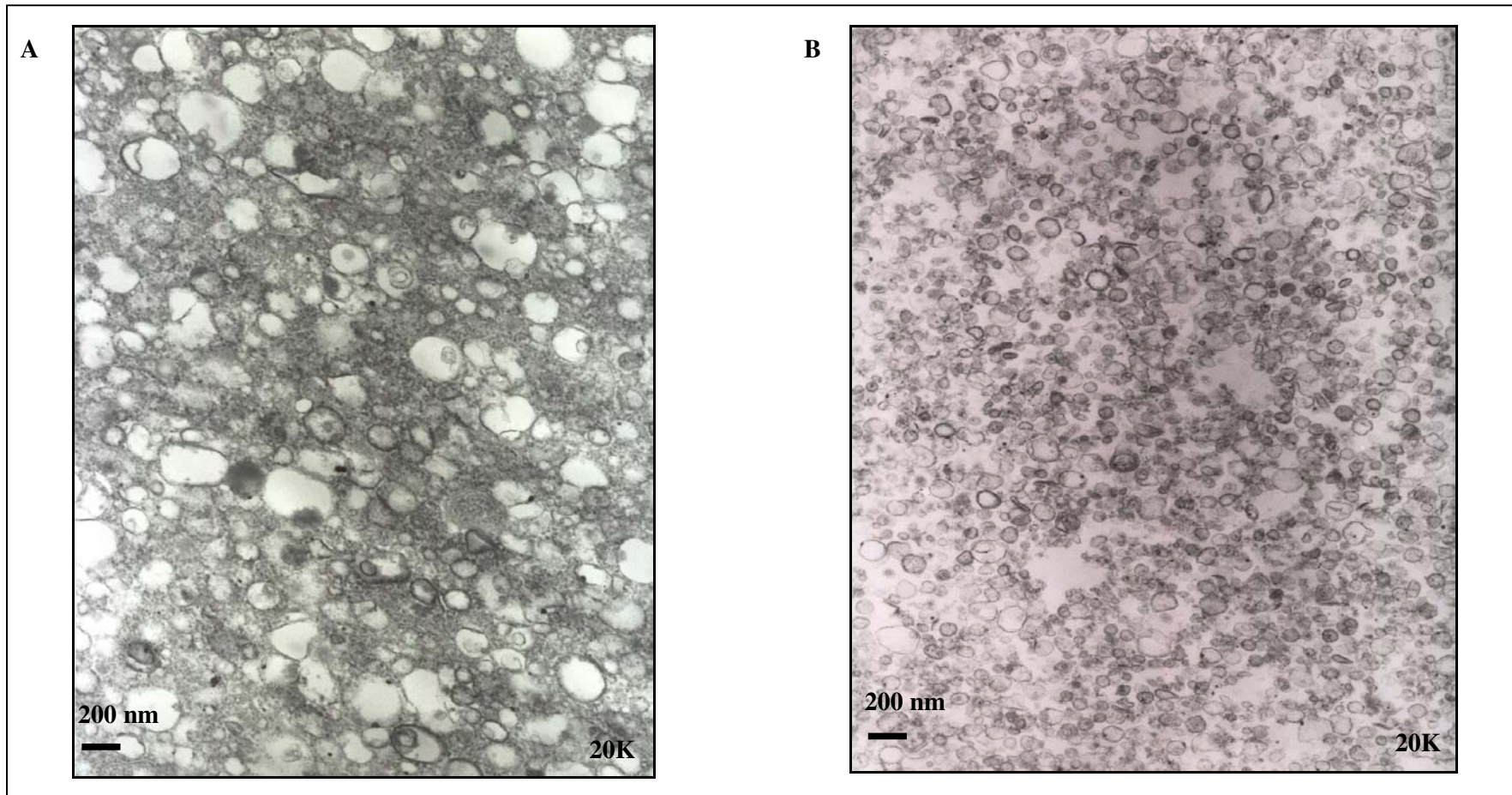


Figura 14.- Micrografías electrónicas de diferentes fracciones membranales de embriones de *Zea mays*. La obtención de las fracciones microsomaes y sus fracciones de VMP correspondientes, así como la microscopía electrónica se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, respectivamente. A. Micrografía electrónica obtenida para la fracción microsomal y B. para las vesículas de membrana plasmática obtenidas de embriones de *Zea mays*.

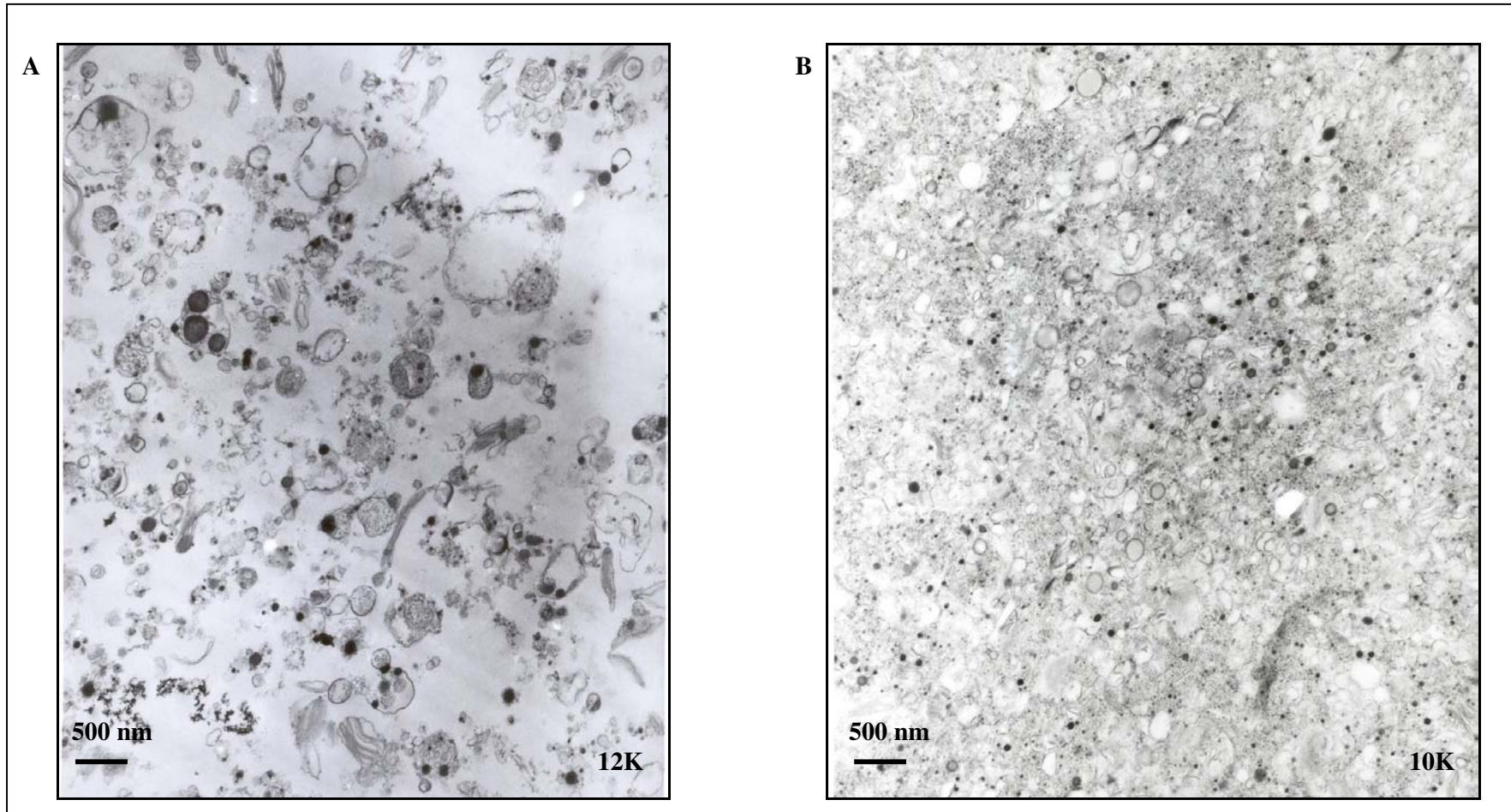


Figura 15.- Micrografías electrónicas de diferentes fracciones membranales de hojas de *Phaseolus vulgaris*. La obtención de las fracciones microsomaes y sus fracciones de VMP correspondientes, así como la microscopía electrónica se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, respectivamente. A. Micrografía electrónica obtenida para la fracción microsomal y B. para las vesículas de membrana plasmática obtenidas de hojas de *Phaseolus vulgaris*.

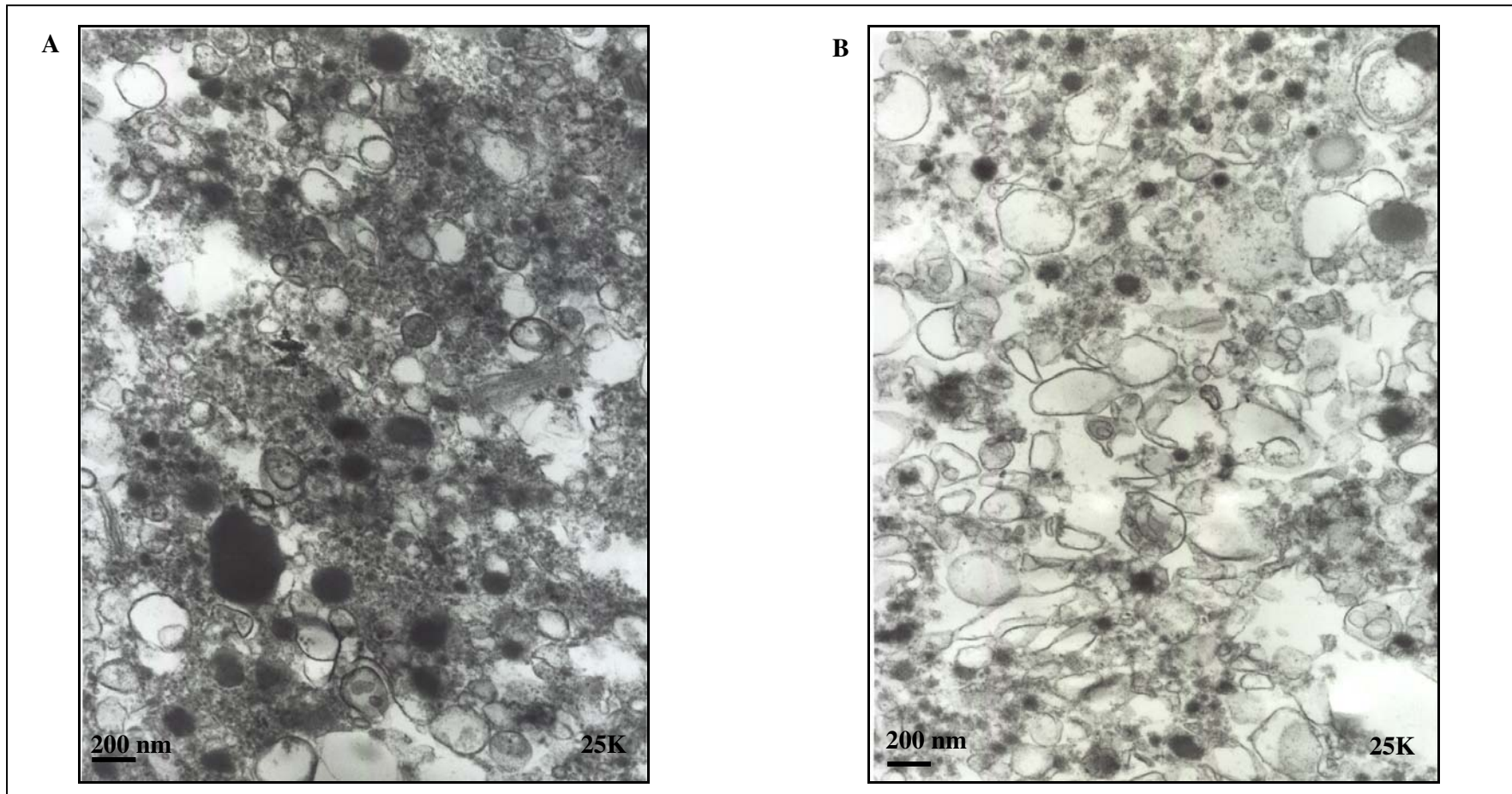


Figura 16.- Micrografías electrónicas de diferentes fracciones membranales de hojas de *Nicotiana tabacum*. La obtención de las fracciones microsomales y sus fracciones de VMP correspondientes, así como la microscopía electrónica se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, respectivamente. A. Micrografía electrónica obtenida para la fracción microsomal y B. para las vesículas de membrana plasmática obtenidas de hojas de hojas de *Nicotiana tabacum*.

Sin embargo, considerando que la formación de las balsas lipídicas tiene lugar en retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, los microdominios también pueden encontrarse en las estructuras de tráfico vesicular, por lo que era más conveniente partir de membranas plasmáticas, y así obtener fracciones de DRMs con membranas de este origen. Los criterios de análisis utilizados en estas fracciones de DRMs se compararon con los análogos de las VMP de las cuales se partió. Por lo tanto, se hizo la obtención de DRMs a partir tanto de VMP de embriones de *Zea mays*, de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* purificadas como se describió en la sección anterior.

Una vez que se obtuvieron aproximadamente 3 mg de proteína de vesículas de membrana plasmática de cada uno de los tres tejidos, se procedió de manera independiente a la obtención de DRMs a partir de estas fracciones, utilizando para ello la relación de detergente/proteína 12.5 (0.0025g Tritón X-100 / 0.0002 g proteína) para cada ensayo (Mongrand *et al.*, 2004). La fracción superior recolectada del gradiente que correspondió a la fracción de DRM de cada tejido fue analizada de acuerdo a su rendimiento, ultraestructura por microscopía electrónica e inmunoréplica (utilizando el anticuerpo contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática) y su perfil lipídico en cromatografía en capa fina. El rendimiento obtenido para cada una de estas preparaciones de DRMs de los diferentes tejidos analizados se muestra en la Tabla VII, siendo de 18%, 10% y 26% comparado con las fracciones de membrana plasmática de *Zea mays*, de *Phaseolus vulgaris* y *Nicotiana tabacum*, respectivamente.

Tabla VII.- Recuperación de las diferentes fracciones membranales obtenidas de embriones de *Zea mays*, de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*. La obtención de DRMs a partir de vesículas de membrana plasmática se realizó como se describió en Materiales y Métodos. DRM, membranas resistentes a detergente; VMP, vesículas de membrana plasmática. Se muestra la media \pm desviación estándar de 6 experimentos independientes.

TIPO DE PREPARACIÓN	RENDIMIENTO DE PROTEÍNA (mg / g de tejido)		
	<i>Zea mays</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
MICROSOMAS	2.4 \pm 0.7	1.3 \pm 0.1	1.0 \pm 0.3
VMP	0.13 \pm 0.04	0.1 \pm 0.06	0.05 \pm 0.02
DRM	0.02 \pm 0.01 18%*	0.01 \pm 0.005 10%*	0.013 \pm 0.006 26%*

*% con respecto a VMP

A. Ultraestructura de las fracciones de DRMs.

Las micrografías electrónicas de transmisión de DRMs obtenidas a partir de microsomas tanto de hojas de *Nicotiana tabacum* como de *Phaseolus vulgaris* se muestran en la Fig. 17A, B. Las micrografías de ambos tejidos mostraron un patrón homogéneo de

estructuras fibrilares no-vesiculares que superan los 500 nm de longitud y algunas estructuras vesiculares no tan abundantes como las primeras, cuyo patrón en general es muy similar al reportado para DRMs de membranas plasmáticas de hojas de *Nicotiana tabacum* y de intestino de cerdo (Fig. 17C, D) (Mongrand *et al.*, 2004; Braccia *et al.*, 2003), también se observó material amorfo en las dos preparaciones.

Como ya se mencionó previamente, se procedió a hacer la obtención de DRMs también a partir de VMP de embriones de *Zea mays*, hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*. Las fracciones de DRM obtenidas a partir de VMP de *Nicotiana tabacum* no se analizaron por microscopía electrónica. Las micrografías electrónicas de las fracciones DRM obtenidas para *Zea mays* y para *Phaseolus vulgaris* se ilustran en la Fig. 18A, B, respectivamente. Las micrografías presentaron estructuras fibrilares no-vesiculares que superaban los 500 nm de longitud y estructuras vesiculares. Ambas formaciones son muy similares en cuanto a morfología y tamaño de los tejidos estudiados y con respecto a los reportes de DRMs en la literatura para epitelio de cerdo (Braccia *et al.*, 2003), hojas de *Nicotiana tabacum* (Mongrand *et al.*, 2004) y levaduras (Idkowiak-Baldys *et al.*, 2004), como

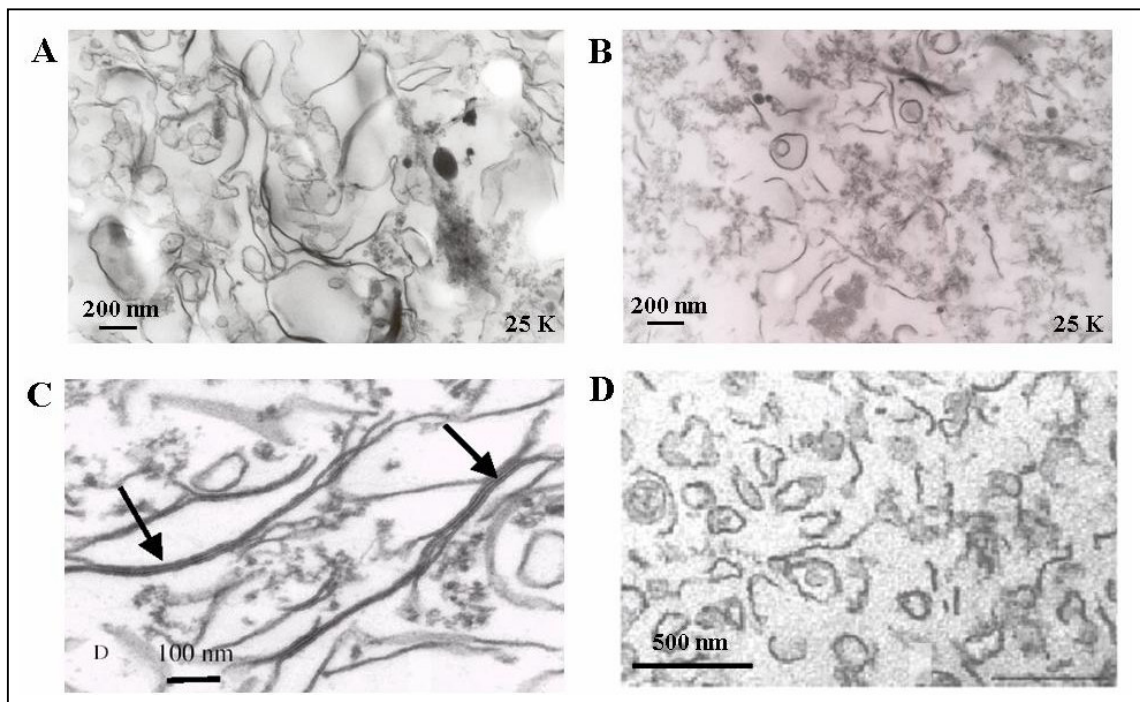


Figura 17.- Micrografías electrónicas de transmisión de DRMs obtenidos a partir de fracción microsomal de hojas de *Nicotiana tabacum* y de *Phaseolus vulgaris*. La obtención de las fracciones microsomaes y sus fracciones de DRM correspondientes, así como la microscopía electrónica se realizaron de acuerdo al inciso b del punto II, a los puntos IV y V de Materiales y Métodos, respectivamente. A-B. Micrografías electrónicas obtenidas para las fracciones de DRM obtenidas de hojas de *Nicotiana tabacum* y de *Phaseolus vulgaris*, respectivamente. C-D. Micrografías electrónicas de hojas de *Nicotiana tabacum* y de intestino de cerdo, tomadas de Mongrand *et al.* (2004) y de Braccia *et al.* (2003), respectivamente.

se muestra en la Fig. 17C, D. Los DRM obtenidos de las 3 especies son también muy semejantes a los obtenidos a partir de microsomas de *Nicotiana tabacum* y de *Phaseolus vulgaris* (Fig. 17A, B). En el caso de *Zea mays*, se presentaron estructuras vesiculares muy abundantes cuyo diámetro fue de 200 nm aproximadamente. Tanto *Zea mays* como *Phaseolus vulgaris* presentaron poca acumulación de material electrodenso.

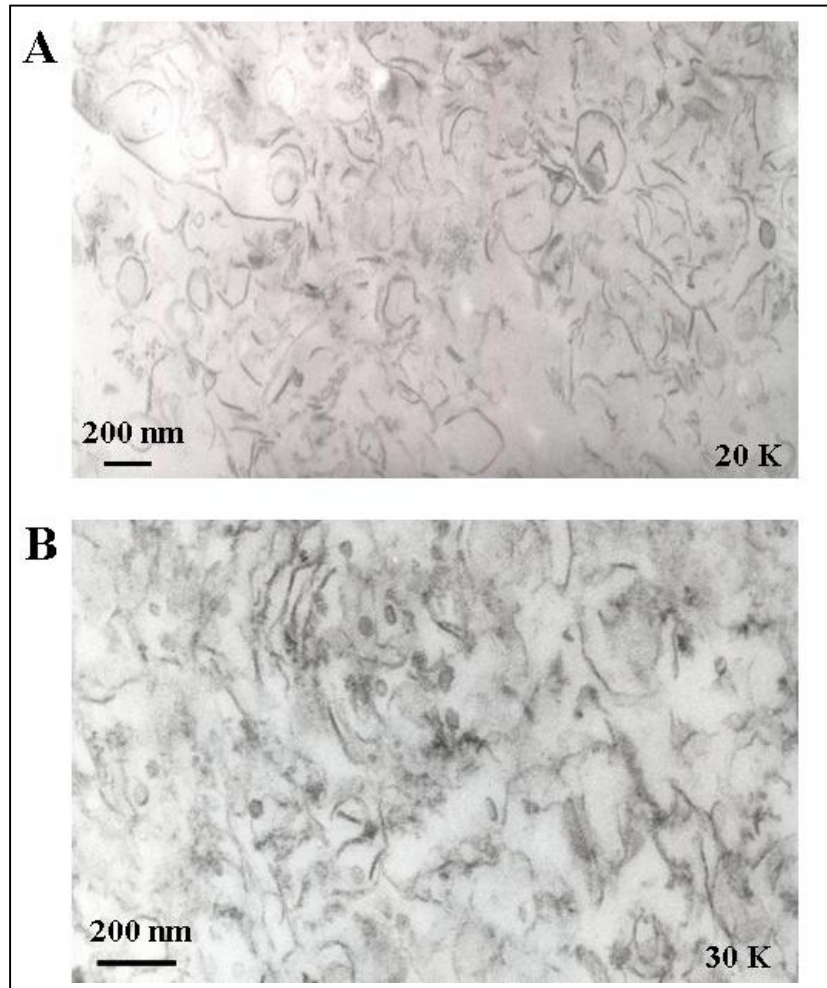


Figura 18.- Micrografías electrónicas de transmisión de DRMs obtenidos a partir de VMP de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris*. La obtención de VMP, de DRMs y la microscopía electrónica se realizó como se describió en Materiales y Métodos. A. Micrografía electrónica obtenida para la fracción de DRM a partir de VMP de embriones de *Zea mays*. B. Micrografía electrónica obtenida para la fracción de DRM a partir de VMP de hojas de *Phaseolus vulgaris*.

B. Detección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en inmunoréplica en VMP y DRMs obtenidos de las tres especies vegetales.

En los DRMs aislados de hojas de *Nicotiana tabacum* y de cotiledones y callo de *Arabidopsis thaliana* (Mongrand *et al.*, 2004; Shahollari *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005), se ha identificado a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática como residente de estas regiones. Por ello, decidimos utilizar a esta enzima como un marcador de los DRMs que se

aislaron en este trabajo. Por lo que en este trabajo se procedió a detectar la presencia de la ATPasa de H^+ utilizando el anticuerpo correspondiente.

Se encontró un enriquecimiento de la enzima en las fracciones de DRM de los tres tejidos como puede observarse en la Fig. 19A. A esta inmunoréplica se le realizó un análisis de densitometría, la cual se muestra en la Fig. 19B. La preparación de DRMs de embriones de *Zea mays* mostró un enriquecimiento de 59.6% de esta enzima con respecto a su fracción de VMP, para el caso de los DRMs obtenidos de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* mostraron un enriquecimiento de 75.1% y de 62.1% con respecto a su fracción de VMP, respectivamente.

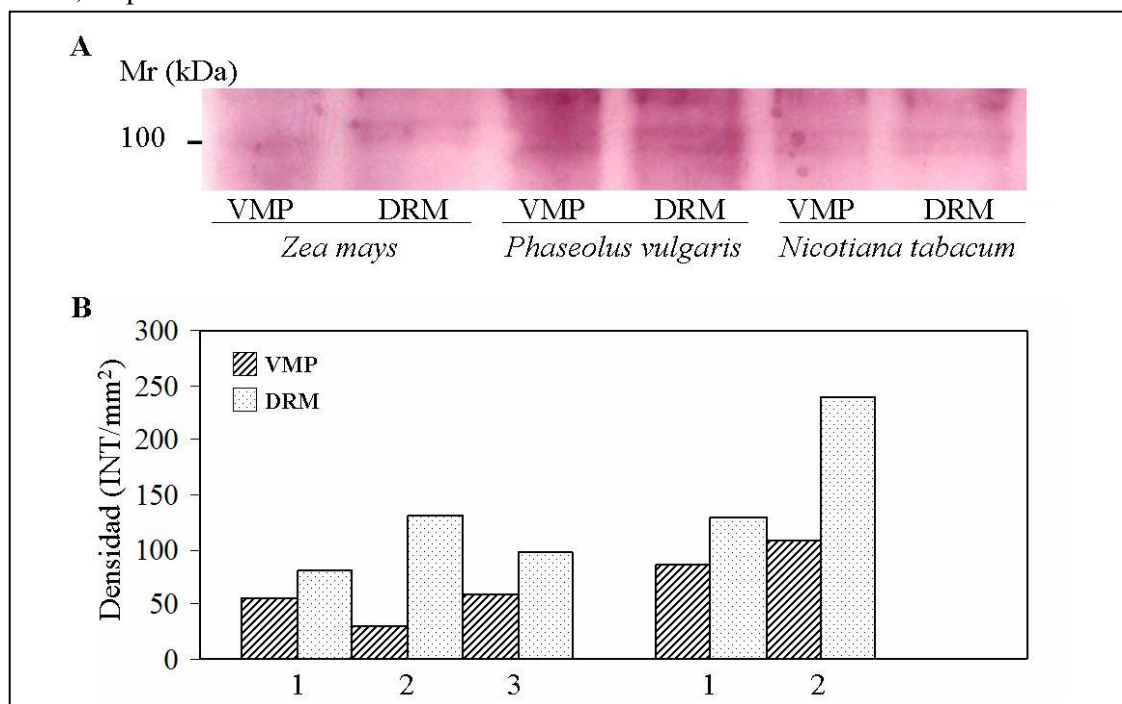


Figura 19. Detección de la ATPasa de H^+ en las fracciones de VMP y de DRM. Las membranas plasmáticas fueron purificadas y solubilizadas con Tritón X-100 al 1% de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, recuperándose la fracción superior del gradiente de densidad y en la que se hizo el ensayo de detección de la ATPasa de H^+ . La inmunoréplica fue desarrollada como se describió en Materiales y Métodos, utilizando 5 μ g de proteína y el anticuerpo de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. A, detección de la ATPasa de H^+ en fracciones de DRM que corresponde a una banda de 100 kDa; B, densitometría de la inmunoréplica. VMP, vesículas de membrana plasmática y DRM, membranas resistentes a solubilización por Tritón X-100; 1, *Zea mays*; 2, *Phaseolus vulgaris* y 3, *Nicotiana tabacum*. El experimento A es representativo de dos experimentos independientes que están considerados en B.

C. Perfil lipídico de las VMP y de DRMs obtenidos de las tres especies vegetales.

El modelo de balsas lipídicas propone que dentro de la membrana plasmática existen ciertas regiones que presentan una composición lipídica enriquecida en esfingolípidos y esteroides, lo cual les confiere una menor fluidez y por lo tanto menor movilidad (Simons e Ikonen, 1997; Simons y Toomre, 2000). De acuerdo a esto, en este trabajo se determinó perfil lipídico de las fracciones de DRM obtenidas a partir de VMP de los tres tejidos estudiados,

con la finalidad de poder contar con una mejor caracterización de estas regiones membranales y compararlos con las VMP de las cuales se aislaron. Para ello, se llevó a cabo la detección de las bases de cadena larga libres más abundantes y por otro lado, se evaluó el perfil de ceramidas libres a través de cromatografía en capa fina (TLC), tanto para las VMP como para las fracciones de DRM obtenidas de los tres tejidos vegetales.

a) Detección de bases de cadena larga (BCL) en los extractos lipídicos de VMP y DRM.

Una vez que se tuvieron las VMP y las fracciones de DRM de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* se procedió a realizar la extracción lipídica de acuerdo al método descrito por Castegnaro *et al.*, 1998, la cual es una extracción alcalina suave que extrae principalmente bases de cadena larga y ceramidas libres. Posteriormente fueron analizadas a través de cromatografía en capa fina utilizando diferentes fases móviles. La Fig. 20, es una cromatoplaqueta teñida con primulina, la cual muestra el perfil de bases de cadena larga tanto para las VMP como para las fracciones de DRM obtenidas de las tres especies vegetales. En primer lugar puede observarse que hubo una recuperación similar de bases de cadena larga en todos los casos, ya que la banda de R_f de 0.57, que corresponde a la esfingosina (utilizada como estándar interno), presentó un tamaño e intensidad similar en todos los carriles de VMP y de DRMs de los tejidos. Puede observarse que las VMP presentaron un perfil lipídico diferente de las fracciones de DRM, mostrando un enriquecimiento en una banda cuyo R_f de 0.26 correspondió al glicerolípido fosfatidiletanolamina y una banda cuyo R_f de 0.16 correspondió a la fosfatidilcolina y que sólo pudo observarse tanto para *Zea mays* como para *Nicotiana tabacum*. En las fracciones de DRM correspondientes a cada especie, se vio disminuída la presencia de estos dos glicerolípidos. Por otro lado, tanto las VMP como las DRMs de las tres especies presentaron una banda cuyo R_f es de 0.36 y que no corresponde a ninguno de los estándares empleados. Es probable que sea una BCL, ya que se tiñe con azul de Coomassie, que reacciona con grupos amino libres y porque migra como un compuesto anfipático, igual que el resto de los compuestos separados con la fase móvil $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 2 N en una relación (40/10/1) en el sistema de TLC que se empleó. Con respecto a las BCL, esfinganina y fitoesfingosina, no se observaron en ninguna de las fracciones membranales.

b) Detección de ceramidas libres en los extractos lipídicos de las diferentes especies estudiadas.

Para la detección de ceramidas libres en las preparaciones provenientes de los tres tejidos estudiados, se realizó la extracción lipídica utilizando como estándar interno a la

ceramida-C₆, la cual no se encuentra en plantas. Los extractos obtenidos se aplicaron a cromatoplasmas eluidos con una fase móvil de una composición muy hidrofóbica (CHCl₃/MeOH/CH₃COOH, 94/1/5, v/v/v) de acuerdo a la naturaleza de estos compuestos. Las Figs. 21 y 22, muestran los resultados obtenidos para la separación de ceramidas libres, las cuales fueron teñidas con cobre y primulina, respectivamente.

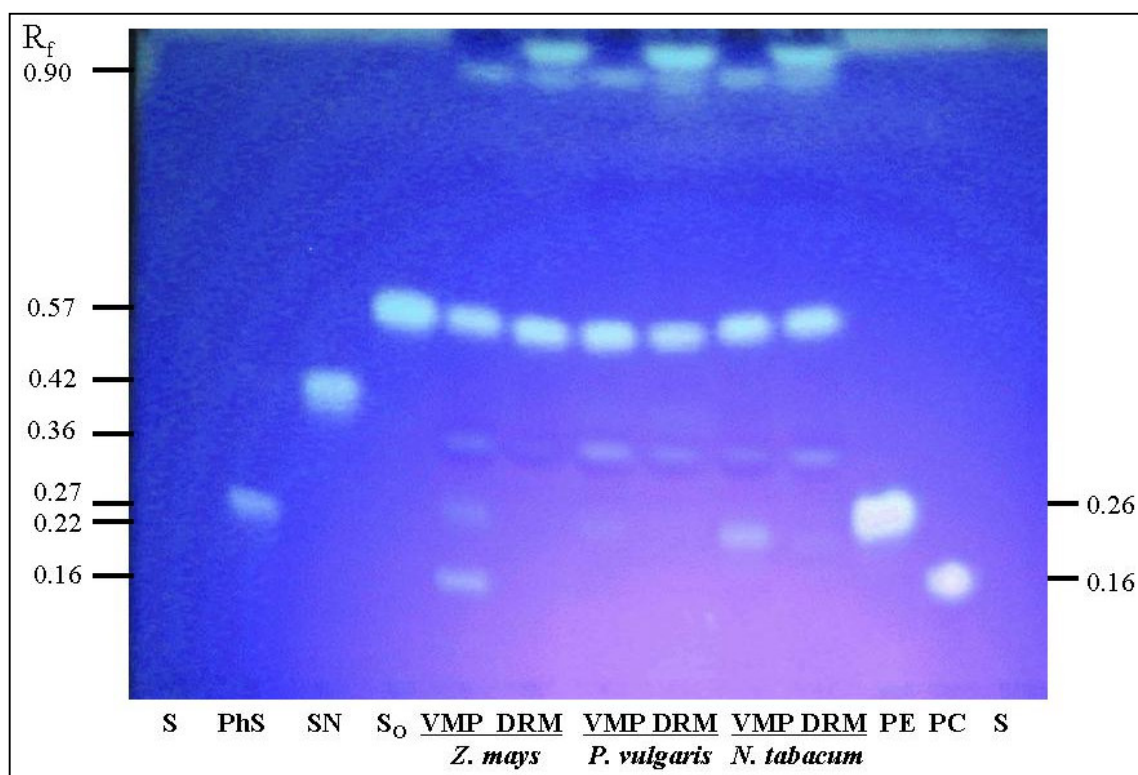


Figura 20.- Determinación de bases de cadena larga (BCL) en las VMP y en fracciones de DRM de embriones de *Zea mays* y hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*. La obtención de VMP y sus fracciones de DRM correspondientes, así como la cromatografía en capa fina, se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, respectivamente. La cromatoplasma obtenida fue teñida con primulina. Donde S, solvente; PhS, Fitoesfingosina; SN, esfinganina; S₀, DL-eritro-dihidro-esfingosina; VMP, vesículas de membrana plasmática; DRM, membranas resistentes al detergente; PE, fosfatidiletanolamina y PC, fosfatidilcolina. La cromatoplasma es una representativa de una serie de tres experimentos independientes.

La banda del estándar de ceramida-C₆ correspondió a las bandas con R_f de 0.32 y de 0.23 en las cromatoplasmas teñidas con cobre como con primulina, respectivamente. Siendo las bandas de tamaños e intensidades similares entre sí en todas las fracciones membranales, lo que indica que se obtuvo una recuperación similar de lípidos extraídos a partir de los tejidos y en particular de BCL en todos los casos. En las VMP obtenidas de *Zea mays*, de *Nicotiana tabacum* y de *Phaseolus vulgaris* prácticamente no se detectaron bandas en ambas cromatoplasmas, excepto para el caso de *Nicotiana tabacum*, en la que se observó una banda con R_f de 0.35 en la cromatoplasma teñida con primulina (Fig. 22) y que correspondió al R_f de

la ceramida-C₁₆. En cambio, el patrón mostrado por las fracciones de DRM de los tres tejidos vegetales estudiados, mostró un enriquecimiento de por lo menos tres bandas con R_f de 0.02, 0.04 y 0.07, que no correspondieron a los estándares de ceramidas libres empleados en estas placas, ni a otros recientemente evaluados, como una glucosilceramida (cuya estructura consiste de un residuo de carbohidrato como grupo polar, una basa de cadena larga y un ácido graso de 18 átomos de carbono), y la que no mostró migración con la fase móvil utilizada en estos experimentos. Las tres bandas no se observaron en las VMP respectivas en ninguna de las especies estudiadas.

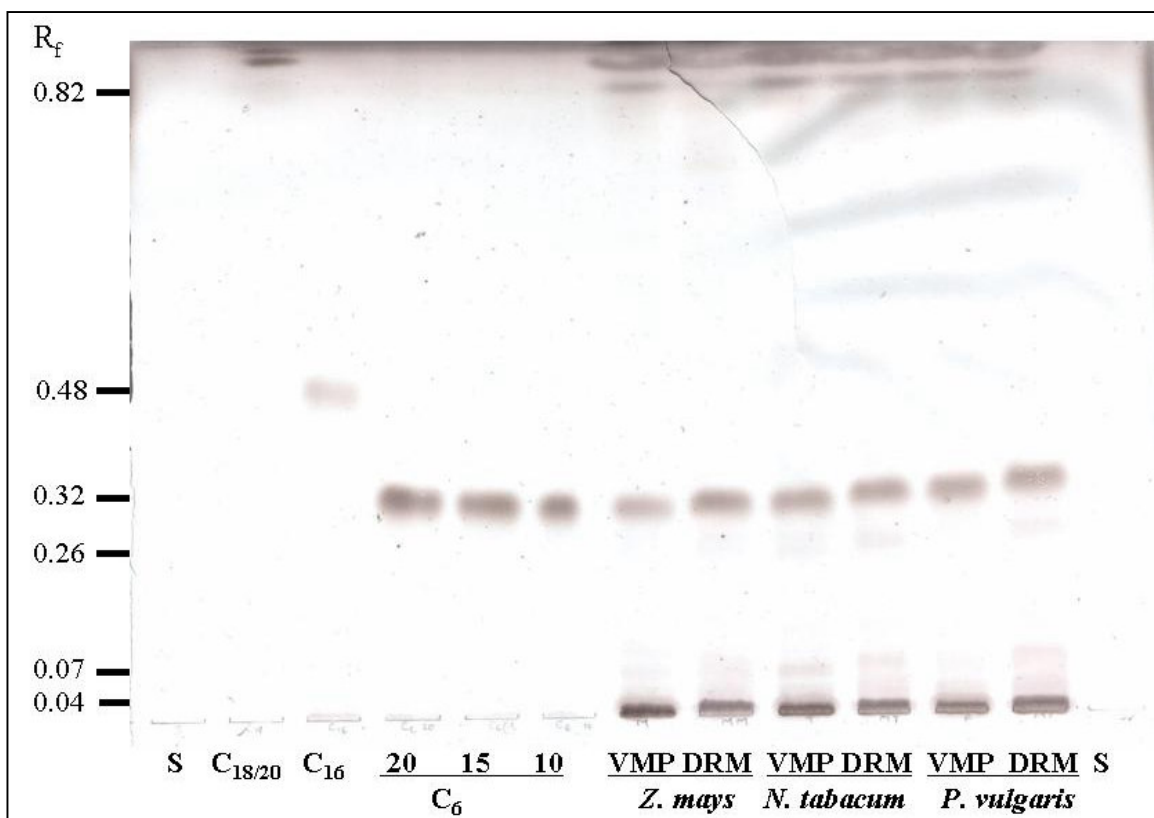


Figura 21.- Determinación de ceramidas en las VMP y en fracciones de DRM de embriones de *Zea mays* y hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* por TLC. La obtención de VMP y sus fracciones de DRM correspondientes, así como la cromatografía en capa fina, se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, respectivamente. La cromatoplaqueta obtenida fue teñida con cobre. Donde S, solvente; C_{18/20}, diglicérido; C₁₆, ceramida-C₁₆; C₆, ceramida-C₆; VMP, vesículas de membrana plasmática; DRM, membranas resistentes al detergente. La cromatoplaqueta es representativa de 3 experimentos.

III. DRMs de tejidos sensibles a la Fumonisina B₁.

Los DRMs fueron obtenidos de las fracciones membranales de los tejidos expuestos a la FB₁ y fueron analizadas de acuerdo a su rendimiento, su ultraestructura, y en el caso de *Zea mays*, su contenido de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. El rendimiento obtenido para las fracciones de DRM de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris*

control y expuestas a la FB_1 se muestra en la Tabla VIII. En ambas especies el rendimiento obtenido para la fracción de DRM en presencia de FB_1 se vió disminuido 14 veces en el caso de los embriones de *Zea mays* y 3 veces en el caso de *Phaseolus vulgaris* con respecto a su control respectivo.

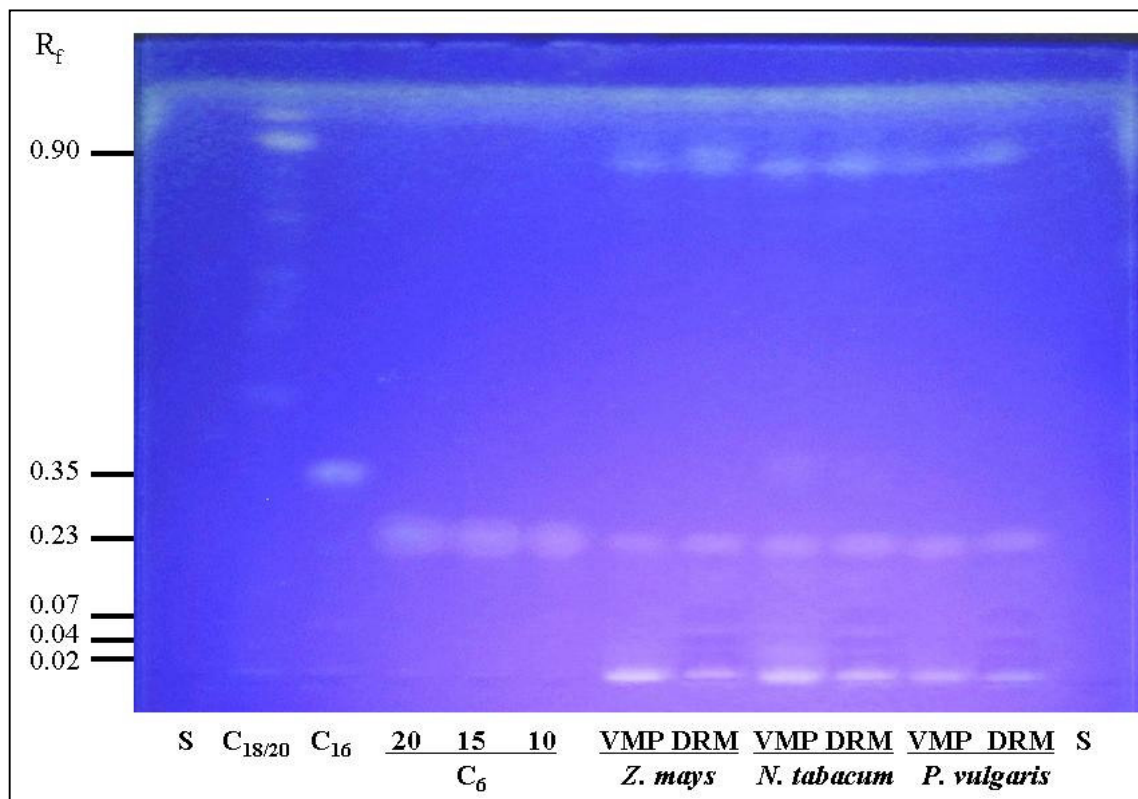


Figura 22.- Determinación de ceramidas en las VMP y en fracciones de DRM de embriones de *Zea mays* y hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*. La obtención de VMP y sus fracciones de DRM correspondientes, así como la cromatografía en capa fina, se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, respectivamente. La cromatoplaque fue teñida con primulina. Donde S, solvente; $C_{18/20}$, diglicérido; C_{16} , ceramida- C_{16} ; C_6 , ceramida- C_6 ; VMP, vesículas de membrana plasmática; DRM, membranas resistentes al detergente. La cromatoplaque es representativa de 2 experimentos independientes.

A. Detección de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en VMP y DRMs obtenidos de embriones de *Zea mays* expuestos a FB_1 .

Como ya se había mencionado anteriormente, la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática fue utilizada como marcador de DRM y se encontró que esta enzima se mostraba enriquecida en estas fracciones de DRM.

Por lo tanto, nos dimos a la tarea de obtener fracciones membranales de esta especie vegetal para analizarlas posteriormente por inmunoréplica utilizando el anticuerpo contra la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. En la Fig. 23A, B puede observarse que en las fracciones microsomales prácticamente no se detectó señal alguna para esta enzima, a diferencia de las VMP en donde sí se detectó. Al comparar los tejidos tratados sin y con FB_1 ,

se apreció una ligera disminución de la enzima en presencia de la Fumonisina B₁. Con respecto a las preparaciones de DRM, éstas se vieron enriquecidas al compararlas con las VMP respectivas, sin encontrarse diferencias entre los DRMs de tejidos tratados con FB₁ y los controles.

Tabla VIII.- Recuperación de las diferentes fracciones membranales obtenidas de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* expuestas \pm FB₁. La obtención de DRMs a partir de vesículas de membrana plasmática se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, en ausencia y presencia de 10 μ M de FB₁. Donde DRM, membranas resistentes a detergente; FB₁, Fumonisina B₁; VMP, vesículas de membrana plasmática. Se muestra la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes

TIPO DE PREPARACIÓN	RENDIMIENTO DE PROTEÍNA (mg/g de tejido)			
	<i>Zea mays</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	- FB ₁	+ FB ₁	- FB ₁	+ FB ₁
MICROSOMAS	2.3 \pm 0.2	2.6 \pm 0.4	2.4 \pm 0.5	2.5 \pm 0.9
VMP	0.07 \pm 0.02	0.09 \pm 0.04	0.02	0.05
DRM	0.02 \pm 0.019	0.002 \pm 0.001	0.01 \pm 0.005	0.008
	29%*	2%*	50%*	16%*

*% con respecto a VMP

La Fig. 23B, que es el control de cargado, mostró que hubieron diferencias cualitativas en cuanto al patrón proteico observado para cada tipo de fracción membranal, lo cual es lógico puesto que son fracciones membranales distintas, pero que en cuanto a la cantidad de proteína son muy similares.

B. Análisis ultraestructural de las fracciones de DRMs obtenidas en las dos especies vegetales sensibles a la FB₁.

Considerando que nuestro interés fue evaluar la formación y estabilidad de las balsas lipídicas utilizando como estrategia el modificar la biosíntesis de esfingolípidos, el análisis ultraestructural de las fracciones de DRM de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* obtenidas bajo estas condiciones, fue una herramienta valiosa para evaluar esto. Por ello, una vez que se obtuvieron las fracciones de DRM de ambas especies en presencia de la toxina, se obtuvieron sus micrografías electrónicas, las cuales se ilustran en la Fig. 24. En el caso de los DRMs obtenidos de embriones de *Zea mays* se detectaron estructuras fibrilares no-vesiculares de 200 nm de longitud y otras entre 50-100 nm de longitud, que resultaron ser

menos abundantes y con una disminución de 57% en tamaño comparado con los DRM obtenidos de embriones de *Zea mays* no expuestos a la toxina.

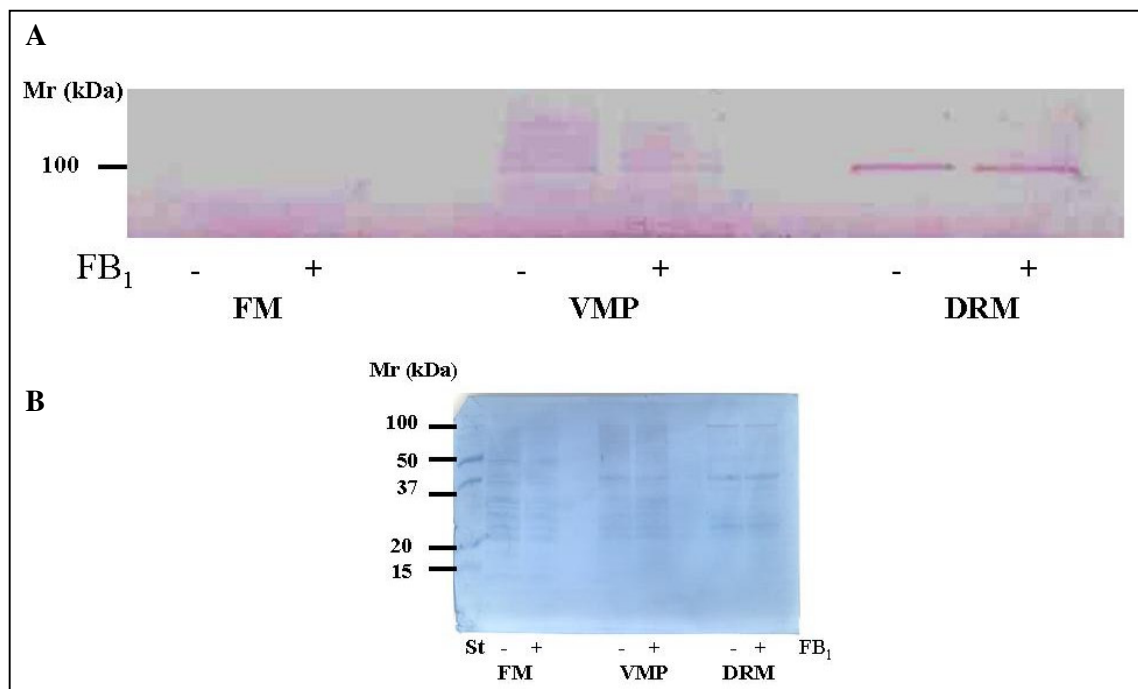


Figura 23.- Estimación de la ATPasa de H⁺ en las diferentes fracciones membranales obtenidas de los embriones de *Zea mays*. Los embriones de *Zea mays* fueron embebidos en ausencia y presencia de FB₁. Las membranas plasmáticas fueron purificadas y solubilizadas con Tritón X-100 al 1% de acuerdo a lo descrito en el punto IV de Materiales y Métodos. La inmunoréplica fue desarrollada como se describió en el punto VII y VIII de Materiales y Métodos utilizando 2.5 µg de proteína y el anticuerpo de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. A, detección de la ATPasa de H⁺ en las diferentes fracciones membranales. B, control de cargado; la membrana de PVDF fue teñida con amido black después de realizado el revelado con fosfatasa alcalina. DRM, membranas resistentes a solubilización por Tritón X-100; FM, fracción microsomal; FB₁, Fumonisina B₁; St, estándar de peso molecular; VMP, vesículas de membrana plasmática; -, ausencia y +, presencia de la toxina.

Por otro lado, la micrografía obtenida para las DRMs de hojas de *Phaseolus vulgaris* infiltradas con FB₁, mostró la presencia de estructuras fibrilares no-vesiculares muy abundantes que presentan entre los 50-500 nm de longitud y algunas que alcanzan 1 µm de longitud que no son tan abundantes, también se pueden observar estructuras vesiculares de entre los 100-200 nm de diámetro. Todas estas estructuras en cuanto a forma son muy similares a las encontradas anteriormente en este trabajo y a las reportadas para plantas en la literatura (Braccia *et al.*, 2003; Mongrand *et al.*, 2004; Idkowiak-Baldys *et al.*, 2004), excepto las estructuras que superan 1 µm de longitud, la cual resultó ser una diferencia muy marcada comparada con los embriones de *Zea mays*, pues en esta especie de monocotiledóneas los DRMs disminuyeron en cuanto a su tamaño, mientras que en los DRMs de la especie de dicotiledóneas, el tamaño se vió aumentado.

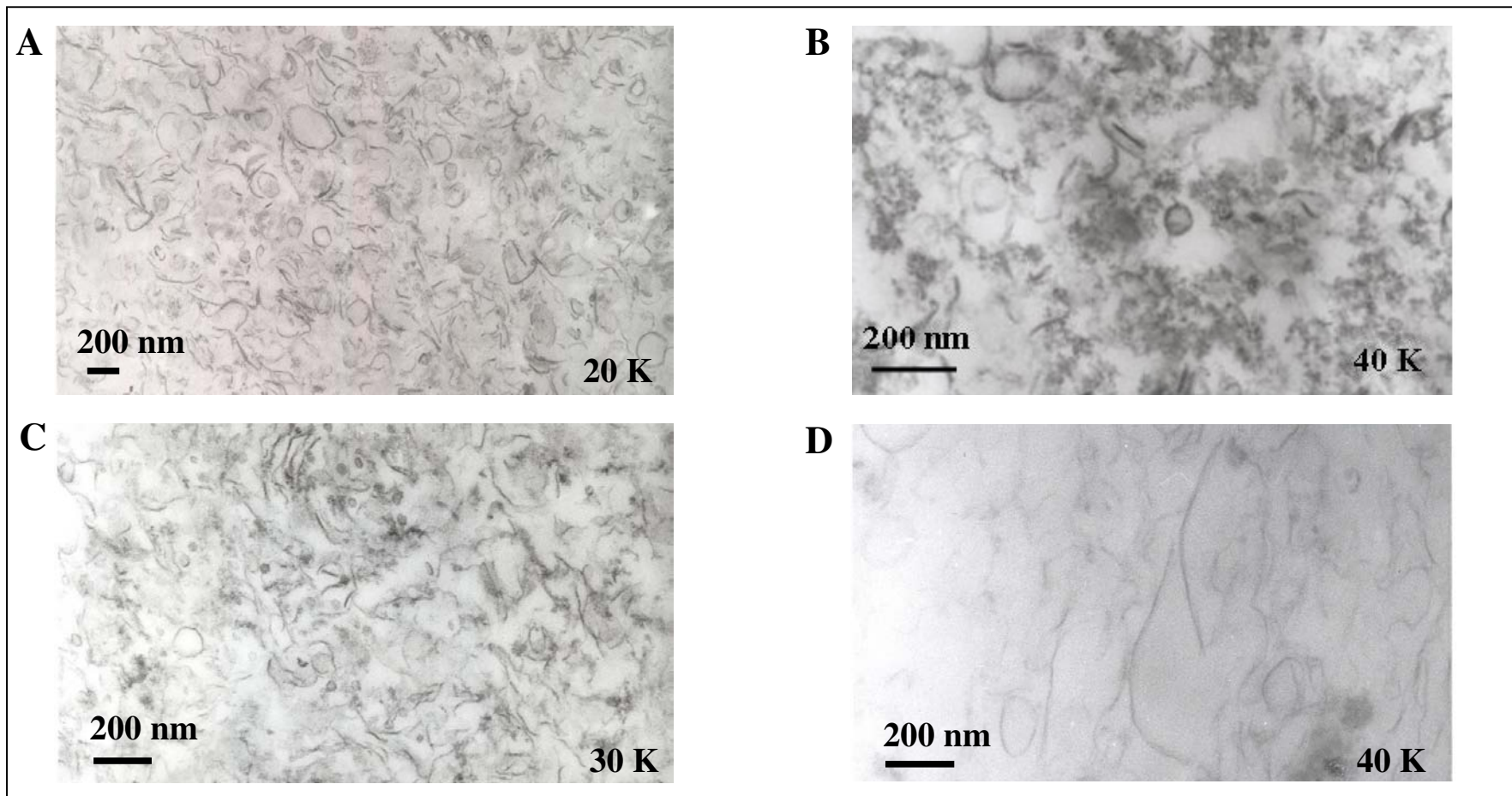


Figura 24.- Micrografías electrónicas de transmisión de DRMs obtenidos a partir de VMP de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* expuestos \pm FB₁. Ambos tejidos fueron expuestos en ausencia y presencia de 10 μ M de FB₁. La obtención de VMP, de DRMs y la microscopía electrónica se realizó como se describió en Materiales y Métodos. A, B. Micrografías electrónicas obtenidas para las fracciones de DRM a partir de VMP de embriones de *Zea mays* embebidos \pm FB₁. C, D. Micrografías electrónicas obtenidas para las fracciones de DRM a partir de VMP de hojas de *Phaseolus vulgaris* infiltradas \pm FB₁.

DISCUSIÓN

El modelo del mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson ha resultado satisfactorio para explicar la mayor parte de los fenómenos que suceden en las membranas biológicas (Vereb *et al.*, 2003). Este modelo predice una difusión lateral libre y al azar de los componentes moleculares de las membranas, homogenizándolos. Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha acumulado evidencia experimental de que en la membrana plasmática de mamíferos y probablemente de todas las células eucarióticas existen heterogeneidades transitorias en la disposición espacial de algunos de los componentes moleculares que la constituyen (Vereb *et al.*, 2003; Lommerse *et al.*, 2004). Este concepto es el de balsas lipídicas, el cual propone que ciertas regiones de la membrana plasmática están enriquecidas en esteroides, así como en esfingolípidos (Simons e Ikonen, 1997; Simons y Toomre, 2000), y presentan una disminución en glicerolípidos insaturados (Bhat y Panstruga, 2005). Estos componentes forman una asociación supramolecular espontánea, basada en una afinidad estructural dada por la interacción entre sus porciones polares y no polares que promueve la formación de una fase líquida ordenada (l_o), lo que resulta en una disminución de la fluidez y movilidad en estas zonas. Se ha propuesto que estas balsas se encuentran coexistiendo con las extensas regiones membranales que presentan la fase líquida desordenada (l_d), cuya composición es abundante en glicerolípidos (Simons e Ikonen, 1997; Simons y Toomre, 2000). Lo anterior sugiere que no existe una difusión lateral libre y al azar entre todos los componentes de la membrana, por lo que este concepto modifica el original del mosaico fluido, y permite la visualización de una modulación diferencial de la arquitectura membranal, a través de la continua restructuración dinámica de zonas con altos niveles de organización que contienen moléculas complejas y que surgen de acuerdo a las necesidades de la célula y de los estímulos en su entorno (Vereb *et al.*, 2003).

De acuerdo a los estudios disponibles, la membrana plasmática de plantas ha resultado ser una estructura tan compleja como la de las otras membranas de eucariontes (Martin *et al.*, 2005), presentando evidencias que sugieren la existencia de balsas lipídicas en diferentes especies vegetales (Peskan *et al.*, 2000; Mongrand *et al.*, 2004; Shaollari *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005; Bhat *et al.*, 2005) en donde han sido aisladas como membranas resistentes a la solubilización por detergente (DRM), que es uno de los criterios más comúnmente empleados. Si bien en el caso de *Arabidopsis* se han presentado, aunque de manera independiente evidencias de balsas lipídicas tanto por aislamiento de DRM (Borner *et al.*, 2005) como por detección con FRET (Bhat *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se evaluó la presencia de balsas lipídicas en otras especies vegetales a través del aislamiento de DRM de la membrana plasmática de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* y manipulando los niveles de uno de los componentes de las balsas lipídicas: los esfingolípidos. La estrategia consistió en modificar los niveles endógenos de esfingolípidos a través de la inhibición de la biosíntesis *de novo* de éstos, utilizando como herramienta a la Fumonisina B₁ (FB₁), que es un inhibidor de una enzima clave de la biosíntesis de esfingolípidos, la esfinganina-*N*-aciltransferasa. Este enfoque original permitió evaluar los requerimientos de esfingolípidos en la formación de DRM en la membrana plasmática de células vegetales, enfoque que no ha sido explorado en la literatura en ningún sistema. Adicionalmente, esta estrategia reforzó los criterios de aislamiento de DRM y permitió sugerir la existencia de balsas lipídicas en estas dos especies vegetales de una manera confiable.

Se utilizaron los embriones de *Zea mays* porque en nuestro laboratorio se han utilizado como un modelo experimental para modificar la biosíntesis de esfingolípidos, encontrándose dos datos relevantes que sirvieron de antecedente para el desarrollo de la presente tesis. El primero fue que la adición de FB₁ a los embriones de *Zea mays* aumentaba 10 veces la cantidad de la BCL esfinganina en la membrana plasmática y reducía los niveles de ceramida/esfingolípidos complejos que son elementos importantes de las balsas lipídicas. El segundo fue que en estas condiciones se encontró que la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática se inhibía debido a una disminución en ceramida/esfingolípidos complejos (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005), lo que apoyaba la detección de la ATPasa de H⁺ en fracciones de DRM de plantas (Mongrand *et al.*, 2004; Shaollari *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005).

Para poder establecer la metodología de aislamiento de DRM se utilizaron las hojas de *Nicotiana tabacum*, especie en la que estaba disponible una caracterización muy completa de DRM (Mongrand *et al.*, 2004). Como resultado, se desarrolló un método que disminuye drásticamente el tiempo de obtención de DRM con respecto al de los reportados en la literatura. Se emplearon las hojas de *Phaseolus vulgaris* como una especie que presenta un tejido similar al de la referencia (*Nicotiana tabacum*) pero que a diferencia de éste, resultaba ser sensible a la acción de la FB₁.

I. El aislamiento de VMP como fracción subcelular para purificar DRM.

El primer objetivo de este proyecto consistió en la obtención de vesículas de membrana plasmática (VMP) de pureza adecuada, ya que a partir de estas fracciones membranales se obtendrían las fracciones DRM de las tres especies vegetales utilizadas en el

presente estudio. La decisión de partir de VMP purificadas obedeció a dos motivos principales: El primero consideró la importancia de la membrana plasmática en la célula, dado que es la primera en percibir, reconocer y transmitir los estímulos del entorno celular y finalmente participa durante la respuesta a éstos. Resultó interesante evaluar la presencia de balsas lipídicas en la membrana plasmática de plantas, debido a que estas regiones membranales pueden desempeñar un papel importante durante estos eventos, como ha sido demostrado en otros tipos celulares. El segundo motivo examinó la posibilidad de que las balsas lipídicas pueden formarse en otras membranas como en el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los compartimentos que se generan durante el tráfico vesicular (Lee *et al.*, 2002). Por lo tanto, era necesario contar con preparaciones enriquecidas en VMP de una buena calidad, para que los DRM obtenidos provinieran de la membrana plasmática.

Considerando que las preparaciones enriquecidas en VMP pueden incluir trazas de otras fracciones subcelulares, para evaluar la calidad de las VMP fue necesario apoyarse en tres diferentes criterios, ya que no existe un criterio absoluto de evaluación de la pureza de una fracción subcelular. Los criterios fueron: actividad de enzimas marcadoras, inmunodetección de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática y ultraestructura membranal. La medición de la actividad de enzimas marcadoras fue a través de la hidrólisis de ATP y empleando inhibidores específicos de estas actividades, que es el criterio más ampliamente utilizado en la literatura (Packer y Douce, 1987; Mongrand *et al.*, 2004), empleando dos enzimas marcadoras de la membrana plasmática (la ATPasa de H^+ y la Glucan sintasa II o GS-II) y tres enzimas marcadoras de otras endomembranas. Las VMP obtenidas a partir de los embriones de *Zea mays* y de las hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* presentaron una pureza adecuada, pues las tres especies presentaron un enriquecimiento de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática y de la actividad de la GS-II. Se encontró para el caso de los embriones de *Zea mays* un enriquecimiento en la actividad de la ATPasa de H^+ de 3 veces y de la GS-II de 2 veces, este enriquecimiento resultó ser bajo comparado con lo reportado en la literatura y que va de 4 a 10 veces (Packer y Douce, 1987). En las VMP provenientes de hojas de *Nicotiana tabacum* se detectó un enriquecimiento de 7 veces en ambas actividades enzimáticas, cuyos valores fueron similares a los valores reportados para la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática y para la GS-II de hojas de *Hordeum vulgare*, de *Nicotiana tabacum* (Packer y Douce, 1987; Mongrand *et al.*, 2004) y de *Avena fatua* (Packer y Douce, 1987), así como a los de hojas de *Vitis vinifera* (Mas *et al.*, 1994). En el caso de las hojas de *Phaseolus vulgaris*, se encontró que el enriquecimiento entre las actividades de la ATPasa de H^+ y de la GS-II fue diferente en magnitud, siendo de 5 y de

10 veces respectivamente. Para el caso de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, su enriquecimiento fue menor comparado con *Nicotiana tabacum*, probablemente en este caso la enzima sea más lábil, ya que para hacer la medición de hidrólisis de ATP fue necesario realizarla inmediatamente de la obtención de las VMP, pues los ciclos de congelamiento-descongelamiento disminuyen notablemente la actividad. El enriquecimiento de la actividad de GS-II resultó ser mayor al obtenido para las VMP de hojas de *Nicotiana tabacum*. Las diferencias en enriquecimiento de la actividad de las dos enzimas marcadoras de la membrana plasmática se debieron muy probablemente entonces a la estabilidad diferente de las dos enzimas, siendo la ATPasa de H⁺ la más sensible a las condiciones de almacenamiento.

Por otro lado, en las preparaciones de VMP de las tres especies vegetales estudiadas, se detectaron bajas actividades de la ATPasa mitocondrial y de la ATPasa de tonoplasto, siendo aproximadamente del 10 % con respecto a la actividad total. Estos valores son similares a lo reportado en la literatura (Packer y Douce, 1987), lo cual indica que en estas preparaciones de VMP hay niveles muy bajos de membranas mitocondriales o de tonoplasto. En las VMP provenientes de los tres tejidos se encontró un enriquecimiento de fosfatasa. Dado que la principal fuente de fosfatasa es la vacuola y las provenientes de este organelo son ácidas, podemos descartar que se trate de fosfatasa vacuolares, porque la actividad enzimática fue realizada a un pH de 7 y porque la actividad de ATPasa de H⁺ de tonoplasto indicó bajos niveles de estas membranas. Estos datos sugieren que la membrana plasmática de las especies estudiadas presenta una abundancia en fosfatasa y que es consistente con un reporte de fosfatasa en la membrana plasmática de *Beta vulgaris* (Armienta-Aldama y González de la Vara, 2004).

Ya que quedaba cierto grado de incertidumbre en las mediciones de la actividad de las enzimas marcadoras en presencia de sus inhibidores clásicos, debido a la naturaleza no absolutamente específica de los mismos, se decidió la utilización de dos criterios adicionales para evaluar la calidad de las VMP: la detección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática con un anticuerpo específico y el análisis ultraestructural de las diferentes fracciones membranales. Considerando estos dos criterios adicionales, el presente estudio de las preparaciones de VMP de las tres especies vegetales supera en número a los parámetros de evaluación de pureza de las VMP utilizados en los reportes recientes de DRM en plantas (Mongrand *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005).

Con respecto a la inmunodetección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, en las tres especies, esta enzima reveló un enriquecimiento en las fracciones de VMP con respecto a su fracción microsomal respectiva. El análisis por densitometría de estas

inmunorélicas mostró un enriquecimiento de 10 veces de la ATPasa de H⁺ en el caso de los embriones de *Zea mays* y que fue mayor con respecto al encontrado en las hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum*, en las cuales el enriquecimiento fue de 2 veces para ambas. Este resultado indica que el procedimiento de purificación en el caso de *Zea mays* es mejor que en los otros dos casos, pero que sólo puede evidenciarse por la detección de la enzima con el anticuerpo y no por su actividad, la cual parece ser lábil como se mencionó anteriormente.

Finalmente, el análisis ultraestructural reveló un enriquecimiento de formaciones vesiculares en las fracciones de VMP en las especies vegetales estudiadas. Se encontró una similitud en cuanto a la forma y tamaño de estas vesículas provenientes de los embriones de *Zea mays* y de las hojas de *Phaseolus vulgaris*, las cuales a su vez fueron similares a las reportadas en nuestro laboratorio con otra variedad de *Zea mays* (Sánchez-Nieto *et al.*, 1997) y al reporte de hojas de *Nicotiana tabacum* var Xanthi (Mongrand *et al.*, 2004), no así para el caso de las VMP de *Nicotiana tabacum*, en donde el tamaño de las vesículas fue diferente, siendo aproximadamente entre 3 y 5 veces mayor, comparado con las VMP obtenidas para los embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris*.

Es importante mencionar que se podría haber obtenido una fracción de VMP con una mayor pureza, para lo cual se habría requerido un paso más de reparto de las VMP en los polímeros acuosos, pero ésto hubiese resultado en la obtención de VMP con rendimientos aún más bajos, lo cual habría dificultado la realización de los objetivos posteriores que involucraban la obtención de las fracciones de DRM. Por ello, se consideró que estas preparaciones de VMP para los embriones de *Zea mays* y para las hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* eran adecuadas, ya que contenían niveles muy reducidos de otras endomembranas, lo cual implicaría una muy baja posibilidad de recuperación de DRM de estos contaminantes membranales.

II. El aislamiento de DRM de una especie monocotiledónea y dos dicotiledóneas.

Se obtuvieron las fracciones de DRM a partir de las VMP obtenidas de las tres especies vegetales referidas en la sección I, utilizando hojas de *Nicotiana tabacum* (línea T11) como tejido-modelo para estandarizar la obtención de fracciones de membrana resistentes a la solubilización por detergente, ya que al inicio de este proyecto sólo existía un reporte muy preliminar de DRM de tabaco (Peskan *et al.*, 2000). En éste, se hacía una descripción muy escueta del procedimiento para aislar DRM, por lo que se tuvieron que tomar elementos adicionales de uno de levadura (Bagnat *et al.*, 2000), para establecer el protocolo final desarrollado en el presente trabajo. Se encontró que éste tiene la ventaja de reducir entre 14-

16 h el tiempo total de obtención con respecto al de los reportes recientes de tejidos vegetales (18-19 h).

En este procedimiento, los DRM se obtuvieron a partir de membranas plasmáticas purificadas, no a partir de homogenados (Bagnat *et al.*, 2000; Chamberlain *et al.*, 2001; Shima *et al.*, 2003) o fracciones microsomales (Hering *et al.*, 2003). En nuestro caso, se utilizó una relación detergente (Tritón X-100)/proteína (p/p) de 12.5, la cual fue menor comparada con la del reporte reciente de hojas de *Nicotiana tabacum*, en donde la relación óptima fue de 15, misma en la que se detectó una disminución en los niveles de glicerolípidos y un aumento en esfingolípidos y esteroides (Mongrand *et al.*, 2004). A su vez, la relación usada en la presente tesis resultó ser mayor a la reportada para callo de *Arabidopsis thaliana* que fue de 6, y en donde se encontró que utilizando una relación mayor a 8 se solubilizaba prácticamente el total de la membrana plasmática (Borner *et al.*, 2005). Por lo tanto, cabría la posibilidad de que la relación de 12.5 utilizada pudiera estar solubilizando, no sólo a las VMP, sino a una fracción de DRM, de acuerdo al reporte de callo de *Arabidopsis*; pero hay que considerar que se trata de un tejido diferente y que por microscopía electrónica seguimos viendo las estructuras típicas encontradas en DRM de otros eucariontes (Braccia *et al.*, 2003; Mongrand *et al.*, 2004). Por otro lado, el utilizar una alta relación (12.5) detergente/proteína, tendría la ventaja de extraer aquellos DRM más insolubles en el detergente y quizás podría evitar la posible extracción de DRM de otros organelos, si es que sus membranas contuvieran relaciones lípido/proteína tales que se vieran más solubilizadas por el Tritón X-100.

Para poder afirmar que se lograron obtener fracciones de DRM en los tejidos de las tres especies vegetales utilizadas en el presente trabajo, ya que no existe un criterio absoluto, fue necesario apoyarnos en diferentes parámetros: rendimiento, ultraestructura, detección de una enzima residente en DRM y perfil lipídico.

Las fracciones de DRM de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* mostraron un rendimiento similar en términos de proteína al reportado en la literatura para hojas de *Nicotiana tabacum* (Mongrand *et al.*, 2004) y de callo de *Arabidopsis thaliana* (Borner *et al.*, 2005), lo cual sugiere cierta similitud en la extractibilidad cuantitativa de las proteínas de DRMs en las membranas plasmáticas de estas especies.

La semejanza entre las DRMs de las tres especies se hizo más evidente con el análisis ultraestructural, ya que mostraron una apariencia parecida tanto entre ellas, como con la de la única ultraestructura reportada para una especie vegetal (Mongrand *et al.*, 2004), con una de mamíferos (Braccia *et al.*, 2003) y con una de levadura (Idkowiak-Baldys *et al.*, 2004). Las estructuras fibrilares observadas que asemejan fragmentos membranales lineales fueron

reportadas también en la mutante de levadura *sur2Δ*, donde la deficiencia en la hidroxilación del C₄ de las bases de cadena larga (BCL) resultó en la apariencia de la estructura de las DRM. Los autores sugirieron que estos cambios podían ser el resultado de diferencias en el contenido proteico o de interacciones lípido-lípido (Idkowiak-Baldys *et al.*, 2004). Trasladando los resultados de las fracciones de DRM obtenidas de los embriones de *Zea mays*, de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* en los que se presentaron tipo estructuras con estas características, se puede sugerir una disminución de los niveles de BCL con hidroxilación en el C₄. En este sentido, de acuerdo al análisis de BCL de las preparaciones de DRM provenientes de las VMP de las tres especies vegetales estudiadas, no se encontraron niveles detectables de fitoesfingosina (que es una BCL que presenta una hidroxilación en el C₄) por TLC. Esta observación coincide con el hecho de que en mamíferos se han detectado bajos niveles de esfingolípidos hidroxilados en el C₄ (Idkowiak-Baldys *et al.*, 2004) y en los que se han encontrado las estructuras fibrilares descritas en esta tesis (Braccia *et al.*, 2003).

Por otro lado, resultó interesante que todas las fracciones de DRM de las tres especies superaban aproximadamente por 5 veces el tamaño de las VMP de las cuales se originaron. Probablemente esto sea el resultado de eventos de fusión entre las membranas que son resistentes a la solubilización por detergente.

En todas las fracciones de DRM obtenidas se observó un enriquecimiento de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Esta enzima ha sido encontrada también en los reportes recientes de DRM en plantas (Mongrand *et al.*, 2004; Shaollari *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005) y de levaduras (Lee *et al.*, 2002; Gaigg *et al.*, 2005), por lo que puede considerarse como un “marcador” de DRM. Este criterio, y el ultraestructural resultaron ser los más convincentes para determinar la presencia de DRM en los embriones de *Zea mays* y hojas de *Phaseolus vulgaris*. Sin embargo, tener información sobre los lípidos de los DRM era fundamental para la comparación con las preparaciones de VMP de las que se originaron.

El perfil lipídico general se estableció con base en la extracción y separación en TLC de lípidos polares membranales, haciendo énfasis en la detección de BCL y ceramidas libres, así como de otros lípidos membranales. Se encontró que los patrones lipídicos resultaron ser diferentes entre las VMP y las fracciones correspondientes de DRM de los tejidos estudiados. Al analizar las BCL de las VMP de las tres especies estudiadas, encontramos una banda de identidad no conocida (R_f de 0.36), y que no correspondía a ninguno de los estándares de BCL analizados ni a los glicerolípidos fosfatidilcolina ni fosfatidiletanolamina. Se ha considerado que esta banda podría ser una BCL porque se tiñe con azul brillante, su

migración es similar a la de otras BCL en la misma fase móvil y podría tratarse de la dehidrofitoesfingosina, ya que ha sido reportada como la BCL más abundante de *Phaseolus vulgaris* (Carter y Koob, 1969). Por otro lado, se observó un enriquecimiento de los glicerolípidos fosfatidilcolina y fosfatidiletalona en las VMP de los embriones de *Zea mays* y de hojas de *Nicotiana tabacum* al compararse con sus DRM respectivos, estos glicerolípidos resultan ser de los más abundantes en la membrana plasmática de plantas (Lynch y Steponkus, 1986; Grandmougin *et al.*, 1989; Mas *et al.*, 1994; Olsson *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997; Bohn *et al.*, 2001; Bérczi y Horvath, 2003). Tales glicerolípidos han sido detectados en fracciones de DRM de eritrocitos de humanos, pero en muy bajos porcentajes, comparados con las fracciones membranales a partir de las cuales se obtuvieron (Koumanov *et al.*, 2005), hecho que es consistente con la composición típica de microdominios membranales, la cual es de esfingolípidos y esteroides principalmente (Simons e Ikonen, 1997; Simons y Toomre, 2000).

El análisis de ceramidas en las fracciones de DRM mostró un patrón con abundancia de bandas con muy bajos R_f , las cuales probablemente son esfingolípidos complejos o bien glicerolípidos con un elevado grado de saturación, los cuales podrían presentar cadenas de ácidos grasos de longitud muy larga (más de 24 átomos de carbono) en su estructura, como ya ha sido reportado para DRM obtenidos de células de mastocitos (Fridriksson *et al.*, 1999) y de eritrocitos de humano (Koumanov *et al.*, 2005), y que, debido a que pueden presentar carbohidratos como grupos polares, retardan su migración en TLC. Sin embargo, el estándar de glucosilceramida no presentó migración en estas condiciones. Por ello, es necesario optimizar la fase móvil con la finalidad de poder separar mejor estas bandas y compararlas con estándares de esfingolípidos complejos de plantas, de los cuales no hay muchos disponibles comercialmente. La identificación por métodos analíticos como la cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GS/MS) es la alternativa más adecuada para identificar estos compuestos (Browse *et al.*, 1986).

La disminución en glicerolípidos y el probable enriquecimiento en esfingolípidos complejos o glicerolípidos con elevado grado de saturación en las DRM aisladas resultaron ser similares a lo reportado en otras especies vegetales (Mongrand *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005) y en células de mamíferos (Fridriksson *et al.*, 1999; Koumanov *et al.*, 2005). No obstante, este criterio de evaluación debe ser fortalecido con una identificación más precisa de los lípidos más abundantes de las fracciones de DRM, en particular, los esfingolípidos complejos, ceramidas, BCL libres y esteroides.

Es importante mencionar que el estudio de las balsas lipídicas a través del aislamiento como fracciones de DRM presenta ciertas limitaciones, ya que si bien es el criterio más ampliamente utilizado para demostrar la existencia de las balsas lipídicas (Munro, 2003), existe controversia acerca de si las fracciones de DRM y las balsas lipídicas son sinónimos (Munro, 2003; Chamberlain, 2004; Lichtenberg *et al.*, 2005). La resistencia a la solubilización por detergente implica que ciertas partes de la estructura de la membrana permanecen en forma de fragmentos de bicapa (que no forman micelas con el detergente) o bien que los componentes residentes en estos microdominios tienden a mantener unidos estos lípidos, mientras que otras regiones membranales sí son solubilizadas. Las razones para que este fenómeno suceda pueden ser de naturaleza termodinámica o cinética. Por lo tanto, las fracciones de DRM son el resultado de una incompleta solubilización de las membranas por detergentes. Las DRMs como tales sólo existen después del tratamiento con el detergente y no necesariamente corresponden a esa estructura en la membrana previa al tratamiento de solubilización. Por ello, es necesario tomar en cuenta varios aspectos, como el efecto de la temperatura sobre el proceso de solubilización, ya que la actividad surfactante del detergente es dependiente de la temperatura (Lichtenberg *et al.*, 2005) y por otro lado, la temperatura también puede influir a los mismos lípidos que constituyen las membranas a través de promover la formación de dominios. Otro aspecto para considerar es el hecho de que detergentes como el Tritón X-100, pueden inducir la formación de dominios l_0 (Heerklotz *et al.*, 2003; Munro, 2003; Lichtenberg *et al.*, 2005) y de que en ciertos casos, dependiendo del detergente empleado se pueden extraer diferentes fracciones de DRM (Chamberlain, 2004; Lichtenberg *et al.*, 2005). En todo caso, esto último refleja la heterogeneidad estructural de los componentes membranales asociados a las balsas lipídicas y cuya extractibilidad es favorecida selectivamente de acuerdo a la estructura del detergente usado.

De acuerdo a lo anterior, la detección de fracciones de DRM no es una evidencia inequívoca para demostrar la existencia de balsas lipídicas en las membranas nativas y de la misma manera, la presencia de una molécula en DRMs no demuestra necesariamente su localización en balsas lipídicas. Sin embargo, resulta muy significativa la correlación que se ha encontrado entre la asociación de ciertas proteínas a DRM y su detección en balsas lipídicas por técnicas espectroscópicas como FRAP y FRET (Varma y Mayor, 1998; Kenworthy *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2004). Por lo tanto, si bien la solubilización selectiva por detergentes presenta ciertas limitaciones, resulta una valiosa herramienta para el estudio de las balsas lipídicas, la cual puede proponerse considerando no sólo la solubilización por

detergentes, sino las evidencias provenientes de otros métodos de estudio (Lichtenberg *et al.*, 2005).

III. El efecto de la FB₁ en los DRM.

Considerando que las DRM en plantas y en otros tipos celulares se encuentran enriquecidas en esfingolípidos y esteroides (Simons e Ikonen, 1997; Simons y Toomre, 2000; Mongrand *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005), en este trabajo se inició el estudio del impacto del desbalance en lípidos esfingoides en la formación de las DRM, utilizando a la FB₁ como agente perturbador, al ser un inhibidor de la biosíntesis de esfingolípidos.

Este trabajo ofrece un enfoque original para abordar el estudio de las balsas lipídicas. Existen reportes en la literatura que han evaluado el papel de la biosíntesis de esfingolípidos en el nivel funcional de las balsas lipídicas, en procesos como el destino proteico de una proteína anclada a glucosilfosfatidilinositol (GPI) denominada Gas1p (Bagnat *et al.*, 2005) y de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (Pma1p), ambas de levadura (Bagnat *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2002; Gaigg *et al.*, 2005), así como durante la interacción patógeno-hospedero (Denny y Smith, 2004), utilizando mutantes de diferentes enzimas de la vía de biosíntesis de esfingolípidos de levadura (Bagnat *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Idkowiak-Baldys *et al.*, 2004) y de protozoarios parasíticos (Denny y Smith, 2004). También hay trabajos que utilizan a la FB₁ como herramienta para modificar la biosíntesis de esfingolípidos (Gaigg *et al.*, 2005), pero no ha sido explorada esta estrategia para evaluar directamente los requerimientos de esfingolípidos en la conformación de las DRM o de balsas lipídicas en la membrana plasmática de estos tipos celulares y mucho menos en células vegetales.

La obtención de DRM a partir de VMP de los embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* expuestas a FB₁ se llevó a cabo considerando que para que la FB₁ pueda servir como un agente que modifica los niveles de esfingolípidos de la membrana plasmática, la concentración y tiempo de administración al sistema biológico en estudio deben estar bien establecidos, ya que se requieren dos condiciones en la membrana plasmática tras la administración de la toxina para que el sistema sea más sencillo y los efectos más fáciles de interpretar: 1) que los niveles de la toxina misma en la membrana plasmática sean nulos o despreciables y 2) que haya un cambio significativo en los niveles de esfingolípidos membranales. En el sistema de embriones de *Zea mays*, estas condiciones se cumplen con la adición de 10 µM de FB₁ por 24 h a los embriones (Gutiérrez, 2005; Gutiérrez-Najera *et al.*, 2005), que es la condición que se utilizó también en este estudio. En el caso de *Phaseolus vulgaris*, que es un sistema en el que se ha incursionado hasta recientemente en el laboratorio,

los niveles conocidos de acumulación de BCL no se han establecido para los tiempos de infiltración de las hojas.

Las fracciones de DRM obtenidas de embriones de *Zea mays* en presencia de FB₁, mostraron un rendimiento disminuido 14 veces con respecto al control, lo cual puede estar relacionado con la disminución de aproximadamente 57% en el tamaño de las DRM de las membranas de embriones con FB₁ comparadas con las del control. Adicionalmente, se ha demostrado que una disminución de esfingolípidos complejos desvía el destino membranal de ciertas proteínas, como la Gas1p y la ATPasa de H⁺, que residen en la membrana plasmática (Lee *et al.*, 2002; Gaigg *et al.*, 2005). De acuerdo a esto, no se puede descartar que la disminución en el rendimiento expresado en términos de proteína se deba a una modificación del destino de algunas proteínas por la acción de la FB₁. Sin embargo, la inmunodetección de la ATPasa de H⁺ en VMP y DRM de embriones de *Zea mays*, reveló que la enzima se encuentra en los mismos niveles con y sin el tratamiento de la toxina, lo cual sugiere que la localización de la enzima es casi exclusivamente en DRM. No obstante, esto no tiene que ser igual para otras proteínas.

Finalmente, si las VMP de embriones expuestos a FB₁ presentaron un aumento de esfinganina de 10 veces con respecto al control (Gutiérrez, 2005; Gutiérrez-Najera *et al.*, 2005) debido a la inhibición de la esfinganina *N*-aciltransferasa, sería de esperarse un descenso similar en ceramidas disponibles para la síntesis de esfingolípidos complejos en la membrana plasmática, lo cual podría explicar la disminución en cantidad y tamaño de las estructuras observadas en los DRM obtenidos de esas membranas. La Figura 25 ilustra lo anterior.

En el caso de las hojas de *Phaseolus vulgaris* infiltradas con H₂O y con FB₁, se obtuvo un rendimiento de DRM disminuido 5 veces con FB₁ comparado con el control. Sin embargo, el análisis estructural de las fracciones de DRM obtenidas a partir de ambas condiciones, reveló un aumento de aproximadamente 5 veces en el tamaño de las estructuras fibrilares provenientes del tratamiento con FB₁ al compararse con el control. Desgraciadamente, en el sistema de *Phaseolus vulgaris*, no se puede hacer una conclusión entre el tiempo de exposición del tejido a la toxina y los niveles de BCL, ya que el análisis de estas últimas solo se ha realizado a nivel de TLC en donde no se ven diferencias entre el control y el tratamiento con FB₁ a las 24 h. Por ello es necesario corroborar los niveles de BCL acumulados por HPLC y hacer esta cuantificación a otros tiempos de exposición a la toxina. Experimentos preliminares han mostrado que hay un aumento de BCL en las VMP expuestas a la FB₁ a tiempos más cortos (dato no mostrado), por lo que es posible que a las 24 h de exposición

estén llevándose a cabo otros eventos celulares posteriores a la perturbación inicial de la síntesis de esfingolípidos por la FB₁, como por ejemplo un aumento en el intercambio de endomembranas, lo que resultaría en un aumento en la formación de balsas lipídicas, debida a un incremento en los niveles de esfingolípidos complejos provenientes de otras membranas. Esto explicaría el aumento en el tamaño de las fibras membranales, aunque no la disminución del rendimiento.

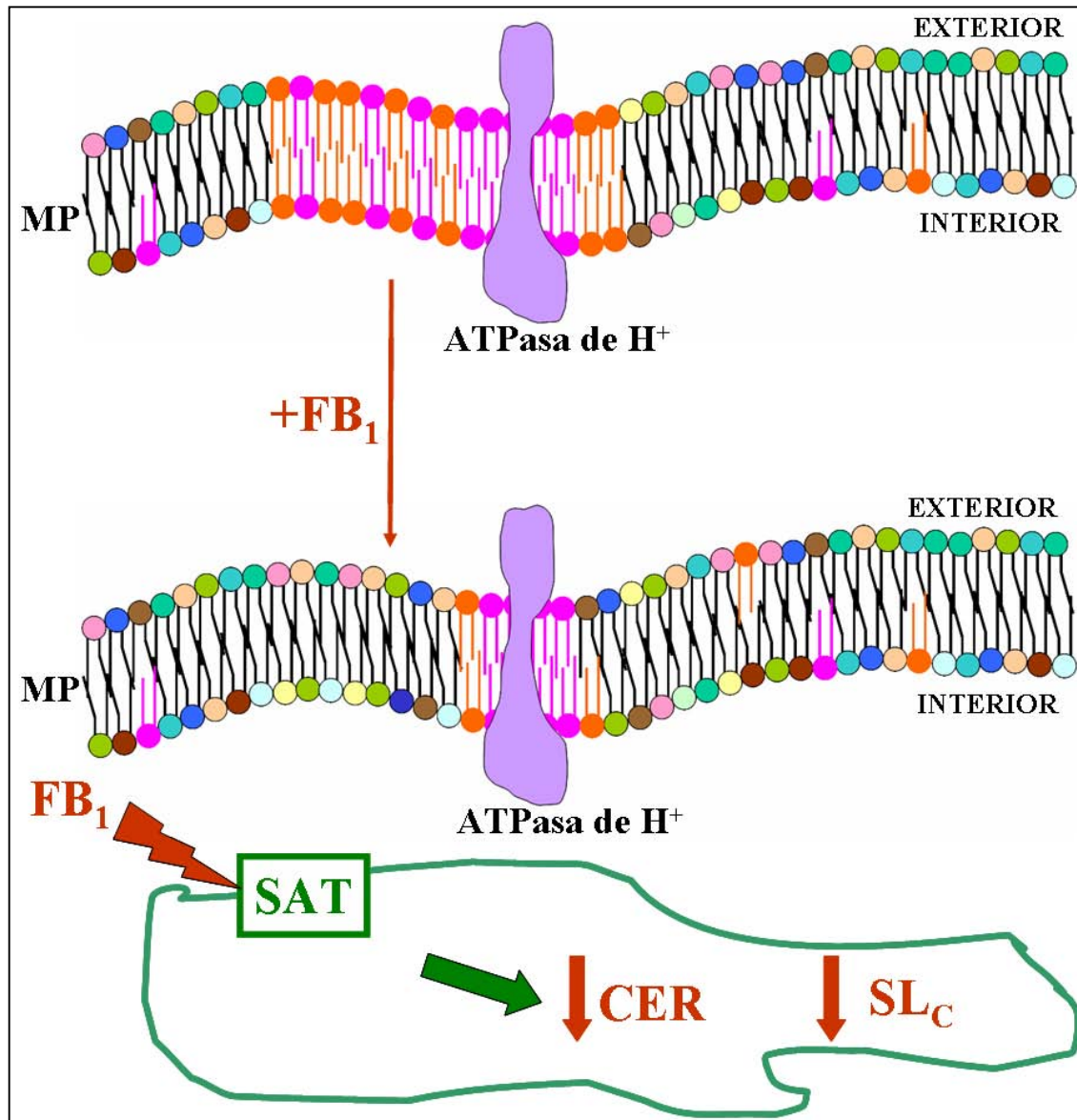


Figura 25.- Modelo del efecto de la FB₁ en las balsas lipídicas de embriones de *Zea mays*. La parte superior de la figura representa una parte de la membrana plasmática de acuerdo al modelo de balsas lipídicas en condiciones normales. Las balsas lipídicas están representadas por las regiones de color naranja y rosa. La bicapa inferior representa la membrana plasmática tras el tratamiento con FB₁. Donde FB₁, Fumonisina B₁; CER, ceramida; MP, membrana plasmática; SAT, esfinganina N-aciltransferasa y SL_C; esfingolípidos complejos.

El desbalance en los niveles de esfingolípidos resultó en cambios estructurales y de composición de las DRMs de ambas especies vegetales sensibles a la FB₁, lo cual sugiere que la dinámica de formación de estas fracciones membranales está influenciada por los niveles de este tipo de lípidos en las especies estudiadas. De acuerdo a este resultado, se puede sugerir que existen balsas lipídicas en la membrana plasmática de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris*, cuya formación se modifica en función de los esfingolípidos endógenos disponibles.

CONCLUSIONES PARTICULARES

1. Se obtuvieron preparaciones enriquecidas en VMP de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de *Nicotiana tabacum* con pureza y cantidad adecuadas, según los criterios de:

- a) Actividad específica de enzimas marcadoras.
- b) Enriquecimiento de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.
- c) Análisis por microscopia electrónica de transmisión.

Estas preparaciones fueron por lo tanto apropiadas para la obtención de fracciones de DRM.

2. A partir de las VMP obtenidas de las tres especies vegetales se aislaron DRM con características similares a otras preparaciones en la literatura y que consisten en:

- a) Presentar rendimientos de entre 10 y 26% con respecto a las VMP.
- b) Poseer una morfología fibrilar.
- c) Estar enriquecidas en la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.
- d) Presentar un perfil lipídico diferente al de las VMP.

3. Se observó que la inhibición de la síntesis de esfingolípidos por FB_1 promovió un cambio en la ultraestructura de las fracciones de DRM, lo cual sugiere que éstas son asociaciones lípido-proteína y lípido-lípido, cuya estructura se ve influenciada por la composición de esfingolípidos endógenos en las dos especies que estudiamos.

CONCLUSIONES GENERALES

Se demostró la presencia de DRMs en la membrana plasmática de una especie de monocotiledóneas y de dos dicotiledóneas.

Los criterios de aislamiento de DRM y de inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos sugieren la existencia de balsas lipídicas en la membrana plasmática de embriones de *Zea mays* y de hojas de *Phaseolus vulgaris*.

Lo anterior indica que las balsas lipídicas son estructuras membranales conservadas, que pueden tener funciones importantes en la célula vegetal al igual que en levaduras y mamíferos.

PERSPECTIVAS

1. Encontrar las condiciones de perturbación de la biosíntesis de esfingolípidos en diferentes grados para producir diferencias cuantitativas en los niveles endógenos de BCLs y esfingolípidos complejos y así evaluar su efecto en la conformación de las balsas lipídicas, apoyándonos en los diferentes parámetros utilizados (ultraestructura; detección de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática por inmunoréplica y perfil lipídico).
2. Utilizar una estrategia alternativa a la utilizada en el punto anterior, como el empleo de mutantes en enzimas clave de la biosíntesis de esfingolípidos en una especie como *A. thaliana*.
3. Identificar algunas de las proteínas presentes en los DRM por medio de una separación bidimensional y degradación de EDMAN o por MALDI-ToF o utilizando anticuerpos específicos.
4. Marcar a la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática con una etiqueta de histidinas y detectarla utilizando anticuerpos fluorescentes para estudiar la dinámica de los compartimentos submembranales y la movilidad de la enzima en los espacios subcelulares (en este caso convendría utilizar protoplastos) y microscopía electrónica de transmisión.
5. Explorar las funciones de las balsas lipídicas en células vegetales, específicamente en relación a su papel en la respuesta de defensa contra patógenos, sometiendo al tejido vegetal a la acción de un patógeno y evaluando las modificaciones en las DRM, de acuerdo a los parámetros que hemos abordado.

APÉNDICE

I. Ácidos grasos

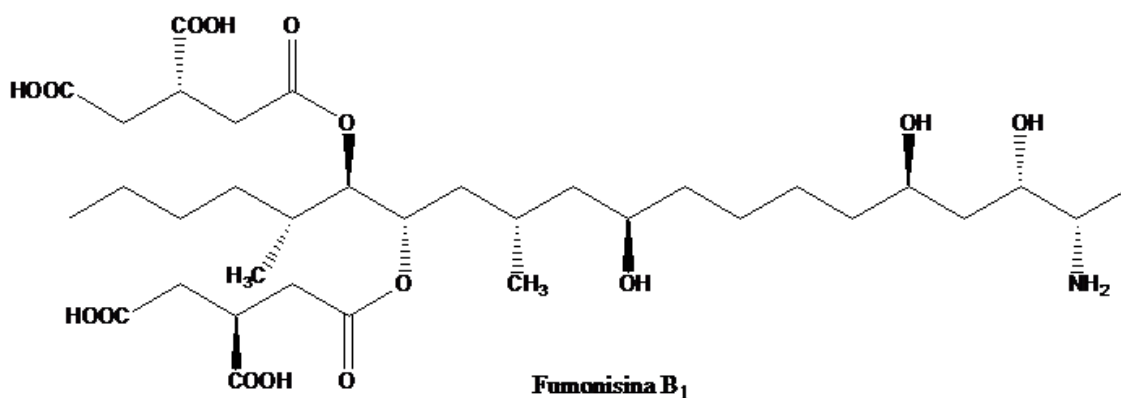
Tanto los glicerolípidos como los esfingolípidos contienen ácidos grasos en su estructura. En membranas, los ácidos grasos se encuentran esterificados al glicerol y denominados glicerolípidos o bien pueden estar esterificados a una base esfingoidea resultando en la formación de ceramidas o esfingolípidos complejos. La vía de biosíntesis de los ácidos grasos es una vía metabólica primaria, debido a que se lleva a cabo en cada célula de la planta y es esencial para su crecimiento (Ohlrogge y Browse, 1995). La síntesis *de novo* de los ácidos grasos en plantas tiene lugar principalmente en plastidios (sitio donde se forman las fracciones de ácidos grasos que predominan en los glicerolípidos) y no está claro si la mitocondria contribuye en una menor extensión con la biosíntesis de ácidos grasos (Dörmann, 2005). Los ácidos grasos son modificados en los mismos plastidios una vez que son sintetizados, pueden ser desaturados, hidroxilados, acetilados, metilados o bien epoxidados (Buchanan *et al.*, 2001). Los ácidos grasos poliinsaturados (aquellos que contienen dos o tres dobles enlaces) están particularmente enriquecidos en membranas fotosintéticas y se sabe que pueden desempeñar papeles críticos en diferentes procesos fisiológicos de las células de las plantas (Dörmann, 2005). Los ácidos grasos en las células nunca se encuentran en la forma de ácidos grasos “libres” y su grupo carboxilo generalmente se encuentra esterificado.

Los principales ácidos grasos de plantas (y en la mayoría de otros organismos) tienen una longitud de cadena de 16 a 18 átomos de carbono y contienen de uno a tres dobles enlaces en configuración *cis*. Cinco ácidos grasos (18:1, 18:2, 18:3, 16:0, y en algunas especies, 16:3) constituyen más del 90% de las cadenas aciladas de la estructura de los glicerolípidos de casi todas las membranas vegetales (Clarkson *et al.*, 1980; Mas *et al.*, 1994; Olson *et al.*, 1994; Ohlrogge y Browse, 1995; Burgos y Donaire, 1996).

II. Fumonisina B₁ (FB₁).

Fusarium moniliforme es uno de los hongos 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 de Sudáfrica 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 (Gelderblom *et al.*, 1988). Hasta 1988, las fumonisinas han sido aisladas de ciertas especies de *Fusarium* (*F. verticillioides* y *F. proliferatum*) y de *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (Soriano *et al.*, 2005). El componente más activo en cultivos de maíz con *F. moniliforme* MRC 826 fue nombrado fumonisina B₁ (FB₁) 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 a continuación (Gelderblom *et al.*, 1988).



Además de la fumonisina B₁, se han reportado fumonisinas homólogas, como son la fumonisina B₂ y la fumonisina B₃, que carecen de uno de los grupos hidroxilos libres del esqueleto hidrocarbonado. La fumonisina B₂ en el C-10 mientras que la fumonisina B₃ 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 B₄, la cual carece de grupos hidroxilo en el C-5 y C-10. Un análogo adicional, es la fumonisina C₁, la cual tiene los mismos sustituyentes que la fumonisina B₁, pero su peso molecular es 14 daltones menor que la FB₁ por carecer del grupo metilo en el C-1.

La fumonisina B₁ 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-pentahidroxiheptadecano. 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 BCL en células animales sugiere que la ruta de 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 FB₁ parece alterar la actividad celular normal de la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos, y se ha encontrado que es un potente inhibidor de 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; Abbas *et al.*, 1994) siendo estos compuestos tóxicos para las células del hospedero.

El grupo amino libre parece desempeñar un papel específico en la actividad biológica de la FB₁, esta actividad conduce a la inhibición de la biosíntesis de ceramida, aumento en los niveles de bases de cadena larga como esfinganina o esfingosina y a una reaclación reducida de esfingosina derivada de esfingolípidos complejos (Soriano *et al.*, 2005). 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 leucoencefalomalacia en caballos, edema pulmonar porcino, nefrotoxicidad y cáncer del hígado en ratas, aterosclerosis en monos, inmunosupresión en aves, hemorragia cerebral en conejos, falla congestiva aguda en el corazón de mandriles, así como recientemente se le ha asociado con la incidencia de cáncer esofágico en humanos (Nelson, 1993; Soriano *et al.*, 2005).

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 B₁ presenta claros efectos fitotóxicos sobre su crecimiento,

Tabla IX. Efecto de la FB₁ 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 ⁺ . 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>Lycopersico esculentum</i>)	5-70 µM	Zonas de necrosis en hojas.	Inducción de la apoptosis. Incremento en bases esfingoideas. Aumento en la fuga de electrolitos.
Lenteja acuática (<i>Lemna pausicostata</i>)	5-70 µM	No descrito	Incremento en bases esfingoideas. Aumento en fuga de electrolitos.
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	5-70 µM	No descrito	Incremento en bases esfingoideas. Aumento en fuga de electrolitos.

Tomado de Gutiérrez, 2005.

inhibiendo la elongación de la radícula hasta en un 75% después de 48 horas de imbibición, así como una inhibición de la producción de las enzimas de la α -amilasa (Doehlert *et al.*, 1994); también se ha encontrado que induce la pudrición en tallo y espiga de maíz (Nelson, 1992). La Tabla IX muestra los efectos de la fumonisina B₁ en algunas especies de plantas.

En particular en nuestro laboratorio, utilizando a la FB₁, se ha obtenido un conjunto de evidencias experimentales que establecen una asociación entre cambios en los niveles de esfingolípidos endógenos celulares y modificaciones en la membrana plasmática como fue referido en la sección de Antecedentes.

Apéndice III. Tabla de proteínas de la membrana plasmática que han sido identificadas experimentalmente en diferentes especies vegetales y se muestran clasificadas de acuerdo a su función.

Proteína	Mr (kDa)	Especie	Número de acceso	DT	Material biológico	Referencias
Transporte						
Transportador ABC (PDR8)	165.8	<i>At</i> ¹	At1g59870	13	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transportador ABC (MDR11)	137.2	<i>At</i>	At3g28860	10	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
ATPasa de H ⁺ de MP ²		<i>At</i>	-----	10	Hojas de <i>At</i>	Santoni <i>et al.</i> , 2000
ATPasa de H ⁺ de MP (AHA1)	104.6	<i>At</i>	At2g18960	10	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
					Cotiledones de <i>At</i>	Shahollari <i>et al.</i> , 2004
					Callo de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2005
ATPasa de H ⁺ de MP (AHA2)	104.7	<i>At</i>	At4g30190	10	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
					Cotiledones de <i>At</i>	Shahollari <i>et al.</i> , 2004
					Callo de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2005
ATPasa de H ⁺ de MP (AHA4)	105.9	<i>At</i>	At3g47950	10	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
					Cotiledones de <i>At</i>	Shahollari <i>et al.</i> , 2004
					Callo de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2005
ATPasa de H ⁺ de MP (AHA11)	105.9	<i>At</i>	At5g62670	10	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
					Cotiledones de <i>At</i>	Shahollari <i>et al.</i> , 2004
					Callo de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2005
ATPasa de Ca ²⁺ de MP (ACA10)	117.5	<i>At</i>	At4g29900	9	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Acuaporina (PIP1)		<i>At</i>	-----	6	Hojas de <i>At</i>	Santoni <i>et al.</i> , 2000;
					Raíces de <i>At</i>	Santoni <i>et al.</i> , 2003

*At*¹ *Arabidopsis thaliana*; MP² membrana plasmática

Proteína	Mr (kDa)	Especie	Número de acceso	DT	Material biológico	Referencias
Acuaporina (PIP1; 1)	30.9	<i>At</i>	At3g61430	6	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004;
Acuaporina (PIP1; 2)	30.8	<i>At</i>	At2g45960	6	Callo de <i>At</i> Hojas de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2005 Marmagne <i>et al.</i> , 2004; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004;
Acuaporina (PIP1; 3)	30.9	<i>At</i>	At1g01620	6	Cotiledones <i>At</i> Callo de <i>At</i> Hojas de <i>At</i>	Shahollari <i>et al.</i> , 2004; Borner <i>et al.</i> , 2005 Marmagne <i>et al.</i> , 2004; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004;
Acuaporina (PIP1; 4)	30.9	<i>At</i>	At4g00430	6	Cotiledones <i>At</i> Hojas de <i>At</i>	Shahollari <i>et al.</i> , 2004; Marmagne <i>et al.</i> , 2004; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Acuaporina (PIP2; 1)	30.7	<i>At</i>	At3g53420	6	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004;
Acuaporina (PIP2; 2)	30.7	<i>At</i>	At2g37170	6	Cotiledones <i>At</i> Hojas de <i>At</i>	Shahollari <i>et al.</i> , 2004; Marmagne <i>et al.</i> , 2004
Acuaporina (PIP2; 3)	30.4	<i>At</i>	At2g37180	6	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Acuaporina (PIP2; 6)	31.3	<i>At</i>	At2g39010	6	Hojas de <i>At</i> Cotiledones <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004; Shahollari <i>et al.</i> , 2004;
Acuaporina (PIP2; 7)	29.8	<i>At</i>	At4g35100	6	Hojas de <i>At</i> Cotiledones <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004; Shahollari <i>et al.</i> , 2004;
Acuaporina (TIP1; 2)	25.9	<i>At</i>	At3g26520	7	Callo de <i>At</i> Hojas de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2005 Marmagne <i>et al.</i> , 2004 Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Acuaporina (TIP2; 1)	25.1	<i>At</i>	At3g16240	6	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004 Alexandersson <i>et al.</i> , 2004

Proteína	Mr (kDa)	Especie	Número de acceso	DT	Material biológico	Referencias
Transportador de sacarosa (SUC1)	55.2	<i>At</i>	At1g71880	12	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transportador de sacarosa (SUC2)	55.0	<i>At</i>	At1g22710	12	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transportador de glucosa (STP1)	57.9	<i>At</i>	At1g11260	12	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004 Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
					Cel. Susp.	Nühse <i>et al.</i> , 2004
Transportador de monosacárido (STP3)	55.0	<i>At</i>	At5g61520	12	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transportador de monosacárido (STP4)	57.5	<i>At</i>	At3g19930	11	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transportador de hexosas? (STP13)	57.4	<i>At</i>	At5g26340	12	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Subunidad β del canal de K^+ (KAB1)	56.7	<i>At</i>	At1g04690	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transportador de cobre (COPT1)	18.5	<i>At</i>	At5g59030	2	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transportador de fosfato (AtPT2)	58.6	<i>At</i>	At2g38940	11	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004
Transportador de fosfato inorgánico (PHT3)	57.3	<i>At</i>	At5g43360	12	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004
Transportador de Mg^{2+} ? (MRS2-5)	47.3	<i>At</i>	At2g03620	2	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transportador de zinc (ZIP2)	38.3	<i>At</i>	At5g59520	8	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004
Transportador de amoníaco (AMT1; 1)	54.1	<i>At</i>	At4g13510	10	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
					Cel. Susp.	Nühse <i>et al.</i> , 2004
Transportador de amoníaco (AMT2)	50.9	<i>At</i>	At2g38290	11	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transportador de péptido?	64.6	<i>At</i>	At3g54140	10	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transportador de auxina	19.1	<i>Os</i>	AF056027	-	Hojas de <i>Os</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 2004
Permeasa LAX1/AUX1?	54.8	<i>At</i>	At5g01240	9	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transportador Lisina/histidina (LHT1)	49.8	<i>At</i>	At5g40780	11	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Antiportador de proteína como nodulina?	66.5	<i>At</i>	At2g39210	10	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Antiportador de proteína como nodulina?	63.6	<i>At</i>	At5g14120	11	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Pirofosfatasa de H^+ (AVP3)	81.5	<i>At</i>	At1g15690	14	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
ATPasa de V (VHA-A)	69.1	<i>At</i>	At1g78900	1	Hojas de <i>At</i>	Santoni <i>et al.</i> , 2000; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
ATPasa de V (VHA-B1)	54.2	<i>At</i>	At1g76030	-	Hojas de <i>At</i>	Santoni <i>et al.</i> , 2000;

Proteína	Mr (kDa)	Especie	Número de acceso	DT	Material biológico	Referencias
ATPasa de V (VHA-B2)	54.3	<i>At</i>	At4g38510	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004 Santoni <i>et al.</i> , 2000; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
ATPasa de V (AVA-P3)	13.9	<i>At</i>	At4g38920	3	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
ATPasa de V (VHA-D)	29.1	<i>At</i>	At3g58730	-	Hojas de <i>At</i>	Santoni <i>et al.</i> , 2000; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
ATPasa de V (VHA-E1)	26.3	<i>At</i>	At4g11150	-	Hojas de <i>At</i>	Santoni <i>et al.</i> , 2000 Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
ATPasa de V (VHA-H)	50.3	<i>At</i>	At3g42050	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transducción de señales						
Cinasa serina/treonina (RLCK VIII)	39.6	<i>At</i>	At1g48210	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa? (RLCK VIII)	45.3	<i>At</i>	At2g43230	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa receptor? (CRPK IL)	98.8	<i>At</i>	At3g51550	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa receptor? (LRR VIII)	104.6	<i>At</i>	At5g49760	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa receptor? (LRR IX)	100.5	<i>At</i>	At3g23750	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa Ser/Thr receptor? (S-Dom)	114.8	<i>At</i>	At1g53430	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa Ser/Thr receptor? (S-Dom)	115.5	<i>At</i>	At3g14840	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa serina/treonina? (DUF26)	70.3	<i>At</i>	At4g23180	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa? (CrPK1)	98.5	<i>At</i>	At5g38990	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa receptor (L-Lectina)	71.9	<i>At</i>	At2g37710	2	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa rica en leucina? (LRR X)	67.8	<i>At</i>	At3g28450	2	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa receptor? (LRR XI)	116.1	<i>At</i>	At4g08850	3	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa rica en leucina? (LRR VII)	71.5	<i>At</i>	At2g31880	2	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa rica en leucina? (LRR III)	68.2	<i>At</i>	At3g02880	2	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cinasa rica en leucina? (LRR III)	72.1	<i>At</i>	At2g26730	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004

Proteína	Mr (kDa)	Especie	Número	DT	Material	Referencias
			De acceso		biológico	
Cinasa? (RLCK II)	70.6	<i>At</i>	At5g41260	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Cinasa? (PPC:1)	41.1	<i>At</i>	At3g26700	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Fototropina (PHOT1)	112.2	<i>At</i>	At3g45780	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Cinasa dependiente de Ca ²⁺ (CPK3)	59.5	<i>At</i>	At4g23650	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Cinasa con dominio de calmodulina (CPK9)	60.7	<i>At</i>	At3g20410	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Cinasa dependiente de Ca ²⁺ (CPK21)	60.2	<i>At</i>	At4g04720	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Proteína de unión a lípido dependiente de Ca ²⁺ ? (CaLB)	55.2	<i>At</i>	At3g61050	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Calmodulina 4	16.8	<i>At</i>	At1g66410	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Subunidad β de la proteína G (ARCA)	36.1	<i>At</i>	At1g18080	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
	20.4	<i>Os</i>	X89737	-	Hojas de <i>Os</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 2004
Fosfolipasa (PLC2)	66.5	<i>At</i>	At3g08510	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Fosfolipasa (PLD)	99.6	<i>At</i>	At4g35790	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Nitrilasa I	38.1	<i>At</i>	At3g44310	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Chaperona de cobre? (ATFP6)	17.2	<i>At</i>	At4g38580	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
GTPasa rac?	49.1	<i>At</i>	At3g11490	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Transferasa O-GlcNAc?	90.9	<i>At</i>	At1g05150	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Transferasa glucosil putativa	53.4	<i>At</i>	At1g10400	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Isomerasa peptidilpropilo (ROC1)	18.6	<i>At</i>	At4g38740	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Nitrilasa I	38.1	<i>At</i>	At3g44310	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Chaperona de cobre? (ATFP6)	17.2	<i>At</i>	At4g38580	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
GTPasa rac?	49.1	<i>At</i>	At3g11490	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Transferasa O-GlcNAc?	90.9	<i>At</i>	At1g05150	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Transferasa glucosil putativa	53.4	<i>At</i>	At1g10400	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004
Isomerasa peptidilpropilo (ROC1)	18.6	<i>At</i>	At4g38740	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al</i> , 2004

Proteína	Mr (kDa)	Especie	Número	DT	Material	Referencias
Tráfico membranal						
Sintaxina (SYP71)	30.1	<i>At</i>	At3g09740	1	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
					Células BY2 <i>Nt</i>	Mongrand <i>et al.</i> , 2004
Sintaxina (SYP121)	38.1	<i>At</i>	At3g11820	1	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Sintaxina (SYP122)	38.0	<i>At</i>	At3g52400	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Sintaxina (SYP132)	34.3	<i>At</i>	At5g08080	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
SNARE 13 (AtNPSN13)	30.4	<i>At</i>	At3g17440	1	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004
Proteína unida a NSF α soluble (ASNAP)	33.2	<i>At</i>	At3g56190	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Proteína membranal acarreadora secretoria (SC3)	32.8	<i>At</i>	At1g61250	4	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Dinamina (ADL3)	91.9	<i>At</i>	At1g59610	-	Hojas de <i>At</i>	Santoni <i>et al.</i> , 2000; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
					Células BY2 <i>Nt</i>	Mongrand <i>et al.</i> , 2004
Anexina (AnnAt1)	36.2	<i>At</i>	At1g35720	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Anexina (AnnAt4)	36.4	<i>At</i>	At2g38750	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Homólogo C de α adaptina	113.1	<i>At</i>	At5g22780	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cadena pesada de clatrina?	191.2	<i>At</i>	At3g08530	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cadena pesada de clatrina?	194.4	<i>At</i>	At3g11130	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Prohibitina	30.8	<i>At</i>	At3g08530	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Prohibitina	30.4	<i>At</i>	At5g40770	1	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004
Proteína nodulina?	52.4	<i>At</i>	At5g25250	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Receptor de secuencia señal?	28.3	<i>At</i>	At2g21160	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Transferasa de oligosacáridos?	48.7	<i>At</i>	At5g66680	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Estrés						
Proteína inducida por harpina (NHL3)	25.9	<i>At</i>	At5g06320	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004

Proteína	Mr (kDa)	Especie	Número	DT	Material	Referencias
Glutación peroxidasa?	19.5	<i>At</i>	At3g63080	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Centrina	19.4	<i>At</i>	At3g50360	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Lectina (JR1)	32.1	<i>At</i>	At3g16470	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Descarboxilasa de glutamato (GAD2)	56.5	<i>At</i>	At1g65960	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Sintasa de callosa (GSL5)	206.9	<i>At</i>	At4g03550	14	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Sintasa de callosa (GSL10)	222.1	<i>At</i>	At3g07160	16	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Organización celular						
Actina 2	42.1	<i>At</i>	At3g18780	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cadena α -6 tubulina	49.5	<i>At</i>	At4g14960	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cadena β -4 tubulina	50.4	<i>At</i>	At5g44340	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cadena β -5 tubulina	50.3	<i>At</i>	At5g19770	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Cadena β -6 tubulina	51.2	<i>At</i>	At5g12250	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Lipoproteína de membrana externa?	21.4	<i>At</i>	At5g58070	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Proteína de unión a selenio?	72.9	<i>At</i>	At2g03880	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Proteínas asociadas a pared celular y ancladas a GPI						
Proteína estelacianina		<i>At</i>	At5g20230		Callo de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2003
Proteína arabinogalactana fasciclina (FLA1)		<i>At</i>	At2g55730	-	Callo de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2003
Proteína arabinogalactana fasciclina (FLA2)	43.6	<i>At</i>	At4g12730	-	Callo de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2003
					Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Proteína arabinogalactana fasciclina (FLA7)	-	<i>At</i>	At2g04780	-	Callo de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2003
Proteína arabinogalactana fasciclina (FLA8)	32.8	<i>At</i>	At2g45470	2	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Proteína arabinogalactana fasciclina (FLA9)	26.2	<i>At</i>	At1g03870	-	Callo de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2003
					Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Proteína arabinogalactana fasciclina (FLA10)	-	<i>At</i>	At2g60900	-	Callo de <i>At</i>	Borner <i>et al.</i> , 2003
Familia 1 Glicosil hidrolasa (BG1)	60.9	<i>At</i>	At1g52400	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004

Proteína	Mr (kDa)	Especie	Número	DT	Material	Referencias
Familia 5 Glicosil hidrolasa	48.7	<i>At</i>	At1g02310	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Familia 9 Glicosil hidrolasa	58.1	<i>At</i>	At1g75680	2	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Familia 17 Glicosil hidrolasa	52.6	<i>At</i>	At5g58090	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Remorina	21.1	<i>At</i>	At2g45820	-	Hojas de <i>At</i>	Marmagne <i>et al.</i> , 2004; Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
					Hojas de <i>Nt</i>	Mongrand <i>et al.</i> , 2004;
					Células BY2 <i>Nt</i>	Mongrand <i>et al.</i> , 2004;
					Cotiledones <i>At</i>	Shaollari <i>et al.</i> , 2004
Esterasa de peptina	65.8	<i>At</i>	At4g12420	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Proteína rica en glicina (GRP7)	16.9	<i>At</i>	At2g21660	1	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Proteína rica en glicina (GRP8)	16.6	<i>At</i>	At4g39260	-	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Proteína rica en glicina (GRP17)	53.4	<i>At</i>	At5g07530	2	Hojas de <i>At</i>	Alexandersson <i>et al.</i> , 2004
Proteína rica en glicina	84.2	<i>Os</i>	AF011331	-	Hojas de <i>Os</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 2004
	67.5	<i>Os</i>	AF011331	-	Hojas de <i>Os</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 2004

Las proteínas se encuentran agrupadas de acuerdo a la similitud funcional. El nombre de la proteína y su abreviatura, si se conoce, se presentan en la columna 1. La masa relativa (Mr) se indica en la columna 2. La especie vegetal se muestra en la columna 3. Los números de accesoión están dados en la columna 4. El número de cruces transmembranales (dominio transmembranal, DT) se presenta en la columna 5. El material biológico utilizado se indica en la columna 6. *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Nt*, *Nicotiana tabacum*; *Os*, *Oryza sativa*.

ABREVIATURAS

AAL- Toxinas producidas por <i>Alternaria alternata</i>	DRM- Membranas resistentes a la solubilización por detergente no-iónico
AGP- Arabinogalactanos	DTT/DTE- DL-ditio/eri/tritol
<i>At- Arabidopsis thaliana</i>	EDTA- Ácido etilendiaminotetracético
ATP- Adenosin trifosfato	EGTA- Etilen glicol-bis (b-aminoetil éter) <i>N, N, N', N'</i> -Ácido tetracético
BCIP- 5-Bromo-4-cloro-3-indoilfosfato <i>p</i> -toluideno	ER- Retículo endoplásmico
BCL- Base de cadena larga	ESI-MS- Espectrometría de masas de la secuenciación de la masa peptídica con ionización por electroasporador
BRs- Brasinosteroides	ESR- Resonancia del spin electrónico
Brij- Polioxietileno lauril éter	F- Fosfatasa
BTP- BIS-Tris-propano	FB ₁ - Fumonisina B ₁
C6- Ceramida-C6, <i>N</i> -hexanoil-D-esfingosina	FCεRI- Receptor Fc que une a IgE
C16- Ceramida-C16, <i>N</i> -palmitoil-D-esfingosina	FM.- Fracción microsomal
C18/20- Diacilglicerol, 1-estearil-2-araquidonoil- <i>sn</i> -glicerol	FRAP- Fluorescencia recuperada después de fotoblanqueo
CCCP- Carbonilcianida- <i>m</i> -clorofenilhidrazona	FRET- Transferencia de la energía por resonancia fluorescente
CHAPS- Desoxicolato sódico, colato sódico, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato	Gal- Galactosa
CL- Cardiolipina	GAP- Proteínas ancladas a glucosilfosfatidilinositol
DEX- Dextrán	GDNF- Factor neurotrópico derivado de células gliales
DGA- Diacilglicerol	GEMs- Membranas enriquecidas en glicolípidos
DGDG- Digalactosil diacilglicerol	GIPC- Glucosil inositol fosforilceramidas
DIC- Contraste de interferencia diferencial	Glu- Glucosa
DIG- Dominios enriquecidos en glicolípidos insolubles en detergente	GluA- Glucosamina
	GluN- <i>N</i> -glucosa

GluNac- <i>N</i> -acetilglucosamina	MCP- Muerte celular programada
GPI- Glucosilfosfatidilinositol	MES- 2-[<i>N</i> -Morfolino] Ácido etanosulfónico
GS-II.- Glucan sintasa II	MF- Mezcla de fases
GS/MS- Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas	MGDG- Monogalactosil diacilglicerol
GTPasa- Hidrolasa de guanosin trifosfato	MOPS- 3-[<i>N</i> -morfolino] propano ácido sulfónico
GUVs- Vesículas unilamelares gigantes	Mr- Masa relativa
HEDTA- Ácido <i>N</i> , hidroxietilendiamina tetracético	NaCl- Cloruro de sodio
HEPES- <i>N</i> -[2-Hidroxietil] piperazina- <i>N'</i> -[2-Ácido etanosulfónico]	NADPH- Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
HGRPs- Proteínas ricas en hidroxiprolina	NBT- Cloruro de 2,2'-bis(4-nitrofenil)-5,5' difenil-3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-difenileno) ditetrazolio, (Nitroblue tetrazolium chloride)
HR- Respuesta de hipersensibilidad	NMR- Resonancia magnética nuclear
IgE- Inmunoglobulina tipo E	ORF- Marco de lectura abierta
Inh- Inhibición	PA- Ácido fosfatídico
Ino (1-P)- Inositol-1-fosfato	PC- Fosfatidilcolina
INT- Intensidad	PE- Fosfatidiletanolamina
ITAMs- Motivos de activación propios de receptores de tirosina	PEG- Polietilenglicol
LBD- Densidad de flotación ligera	PG- Fosfatidilglicerol
ld- Fase líquida desordenada	PI- Fosfatidilinositol
LDTI- Fracciones de baja densidad insolubles en tritón	PIPES- Fenilmetilo-sulfonilo fluorado
lo- Fase líquida ordenada	PS- Fosfatidilserina
LPS- Lipopolisacáridos	PhS- Fitoesfingosina (4-hidroesfinganina)
M- Mitocondria	PVDF- Polivinildifluoruro
MALDI-ToF-MS- Espectrometría de masas en tiempo de vuelo utilizando una matriz asistida por ionización/desorción de láser	RAS- GTPasa pequeña
Man- Manosa	RE- Retículo endoplásmico
MAPK- Cinasa activada por mitógeno	S- Solvente
	SAT- Esfinganina <i>N</i> -aciltransferasa
	SBD- Dominio de unión a esfingolípidos

SDS- Dodecil sulfato de sodio	TEMED- <i>N, N, N', N'</i> - Tetrametiletilendiamina
SF- Sistema de fases	TIFF- Fracciones flotantes insolubles en tritón
SHiPS- Resource Center for Sociology, History and Philosophy in Science teaching	TIM.- Membranas insolubles en tritón
SL- Sufoquinovosil diacilglicerol	TLC- Cromatografía en capa fina
SN- Esfinganina, Dihidroesfingosina	Tris (Trizma base)- Tris (hidroximetil) amino metano
So- Esfingosina, <i>D, E</i> -esfingo-4-enina	Tritón X- Polioxietilen- <i>p</i> -isooctilfenil éter
SPT- Serina palmitoil transferasa	TX100- Tritón X-100
T- Tonoplasto	VMP- Vesículas de membrana plasmática
T. amb.- Temperatura ambiente	
TCR- Receptor de antígenos de las células T	

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, H. K., Paul, R. N., Boyette, C. D., Duke, S. O. y Vesonder, R. F. (1992) Physiological and ultrastructural effects of fumonisins on jimsonweed leaves. *Can. J. Bot.* 70:1824-1833.

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. (1994) Fumonisin and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipids metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.* 106:1085-1093.

Ahmed, S. N., Brown, D. A. y London, E. (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* 36:10944-10953.

Alexandersson, E., Saalbach, G., Larsson, C. y Kjellbom, P. (2004) *Arabidopsis* plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant Cell Physiol.* 45:1543-1556.

Anderson, R. G. W. Y Jacobson, K. (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296:1821-1825.

Armienta-Aldana, E. y González de la Vara, L. E. (2004) Acid phosphatases from beet root (*Beta vulgaris*) plasma membranes. *Physiol. Plant.* 121:223-230.

Bagnat, M., Keränen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. y Simons, K. (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3254-3259.

Benveniste, P. (2005) In (Murphy, D. J. ed.) *Plant Lipids. Biology, Utilisation and Manipulation. Prenylipids and their derivatives: sterols, phenylquinones, carotenoids and terpenoids.* 1^a Edición. Blackwell Publishing, Oxford. pp. 123-162, 365.

Bérczi, A. y Horvath, G. (2003) Lipid rafts in the plasma membrane? *Acta Biol. Szeged.* 47:7-10.

Bhat, R. A., Miklis, M., Schmelzer, E., Schulze-Lefert, P y Panstruga, P. (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:3135-3140.

Bhat, R. A. y Panstruga, R. (2005) Lipid rafts in plants. *Planta* 223:5-19.

Binder, W. H., Barragan, V. y Menger, F. M. (2003) Domains and rafts in lipid membranes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:5802-5827.

Bohn, M., Heinz, E. y Luthje, S. (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 387:35-40.

- Borner, G. H.H., Lilley, K. S., Stevens, T. J. y Dupree, P. (2003) Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol.* 132:568-577.
- Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., MacAskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S. y Dupree, P. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* 137:104-116.
- Brandt, R. D. y Benveniste, P. (1972) Isolation and identification of sterols from subcellular fractions of bean leaves (*Phaseolus vulgaris*). *Biochim. Biophys. Acta* 282:85-92.
- Brown, F. L. (2003) Regulation of protein mobility via thermal membrane undulations. *Biophys. J.* 84:842-853.
- Brown, D. A. y London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:111-136.
- Browse, J., McCourt, P. J. y Somerville, C. R. (1986) Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Anal. Biochem.* 152:141-145.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. y Jones, R. L. (2001) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland pp. 1-13, 456-497.
- Burgos, P. A. y Donaire, J. P. (1996) Phospholipids, free sterols, fluidity, and ATPase activity of plasma membrane-enriched vesicles from sunflower and jojoba roots. *Plant Physiol. Biochem.* 34:315-324.
- Carmona, S. L. (2003) Identificación de polipéptidos fosforilados diferencialmente en embriones de maíz expuestos a la Fumonisina B₁. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM.
- Carter, H. E. y Koob, J. L. (1969) Sphingolipids in bean leaves (*Phaseolus vulgaris*). *J. Lipid Res.* 10:363-369.
- Castegnaro, M., Garren, L., Galendo, D., Gelderblom, W.C.A., Chelule, P., Dutton, M.F. y Wild, C.P. (1998) Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *J. Chromatogr.* 720:15-24.
- Chamberlain, L. H. (2004) Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Lett.* 559:1-5.
- Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D. y Gould, G. W. (2001) SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:5619-5624.

- Clarkson, D. T., Hall, K. C. y Roberts, K. M. (1980) Phospholipid composition and fatty acid desaturation in the roots of rye during acclimatization to low temperature. *Planta* 149:464-471.
- Coursol, S., Le Stunff, H., Lynch, D. V., Gilroy, S., Assmann, S. M. y Spiegel, S. (2005) *Arabidopsis* sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiol.* 137:724-737.
- Cowan, D. S. C., Cooke, D. T., Clarkson, D. T. y Hall, J. L. (1993) Lipid and sterol composition of plasma membranes isolated from stele and cortex of maize roots. *J. Exp. Bot.* 44:991-994.
- Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N. y Rosenbusch, J. P. (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358:727-733.
- Curatolo, W. (1987) The physical properties of glycolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 906:111-136.
- Datta, D. B. (1987) A Comprehensive Introduction to Membrane Biochemistry. Floral Publishing Madison, Madison, Wisconsin pp. 23-102.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. y Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* 318:618-624.
- Denny, P. W. y Smith, D. F. (2004) Rafts and sphingolipids biosynthesis in the kinetoplastid parasitic protozoa. *Mol. Microbiol.* 53:725-733.
- Desjardins, A. E. y Hohn, T. M. (1997) Mycotoxins in plant patogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 10:147-152.
- Dietrich, C., Bagatolli, L. A., Volovyk, Z. N., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K. y Gratton, E. (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.* 80:1417-1428.
- Doehlert, D. C., Knutson, C. A. y Vesonder, R. F. (1994) Phytotoxic effects of fumonisin B₁ on maize seedling growth. *Mycopathology* 127:117-121.
- Dörmann, P. (2005) In (Murphy, D. J. ed.) *Plant Lipids Biology, Utilisation and Manipulation. Membrane lipids*. 1ª. Edición. Blackwell Publishing, Oxford. pp. 123-162.
- Dunn, T. M., Lynch, D. V., Michaelson, L. V. y Napier, J. A. (2004) A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot-London* 93:483-497.
- Edidin, M. (2003) Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4:414- 418.

- Edidin, M. y Stroynowski, I. (1991) Differences between the lateral organization of conventional and inositol phospholipid-anchored membrane proteins. A further definition of micrometer scale membrane domains. *J. Cell Biol.* 112:1143-1150.
- Ephritikhine, G., Ferro, M. y Rolland, N. (2004) Plant membrane proteomics. *Plant Physiol. Biochem.* 42:943-962.
- Fantini, J. (2003) How sphingolipids bind and shape proteins: molecular basis of lipid-protein interactions in lipid shells, rafts and related biomembrane domains. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:1027-1032.
- Ferguson, A. D., Welte, W., Hofmann, E., Lindner, B., Holst, O., Coulton, J. W. y Diederichs, K. (2000) A conserved structural motif for lipopolysaccharide recognition by prokaryotic and eukaryotic proteins. *Structure* 8:585-592.
- Fridriksson, E. K., Shipkova, P. A., Sheets, E. D., Holowka, D., Baird, B. y McLafferty, F. W. (1999) Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. *Biochemistry* 38:8056-8063.
- Friedrichson, T. y Kurzchalia, T. V. (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* 394:802-804.
- Gaigg, B., Timischl, B., Corbino, L. y Schneiter, R. (2005) Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast. *J. Biol. Chem.* 280:22515-22522.
- Gaus, K., Gratton, E., Kable, E. P. W., Jones, A. S., Gelissen, I., Kritharides, L. y Jessup, W. (2003) Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:15554-15559.
- Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vleggaar, R. y Kreik, N. P. J. (1988) Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1806-1811.
- González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S. y Gavilanes-Ruíz, M. (1992) A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration. *Anal. Biochem.* 200:235-238.
- Grandmougin, A., Bouvier-Navé, P., Ullmann, P., Benveniste, P. y Hartmann, M-A. (1989) Cyclopropyl sterol and phospholipid composition of membrane fractions from maize roots treated with fenpropimorph. *Plant Physiol.* 90:591-597.
- Grassmé, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kürthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R. y Gulbins, E. (2003) Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nature Med.* 9:322-330.

- Gutiérrez, N. N. (2005) Interacción de la Fumonisin B₁ con la membrana plasmática: efectos en la bicapa lipídica y en la actividad enzimática. Tesis de Doctorado. Fac. de Química, UNAM.
- Gutiérrez-Nájera, N., Muñoz-Clares, R. A., Palacios-Bahena, S., Ramírez, J., Sánchez-Nieto, S., Plasencia, J. y Gavilanes-Ruíz, M. (2005) Fumonisin B₁, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221:589-596.
- Hartmann, M-A., Perret, A-M., Carde J-P., Cassagne, C. y Moreau, P. (2002) Inhibition of the sterol pathway in leek seedlings impairs phosphatidylserine and glucosylceramide synthesis but triggers an accumulation of triacylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta* 1583:285-296.
- Hearn, J. D., Lester, R. L. y Dickson, R. C. (2003) The uracil transporter Fur4p associates with lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 278:3679-3686.
- Heerklotz, H., Szadkowska, H., Anderson, T. y Seelig, J. (2003) The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of triton. *J. Mol. Biol.* 329:793-799.
- Hering, H., Lin, C-C. y Sheng, M. (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* 23:3262-3271.
- Holthuis, J. C. M. y Levine, T. P. (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:209-220.
- Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J. y Sandhoff, K. (2000) Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1485:63-99.
- Idkowiak-Baldys, J., Grilley, M. M. y Takemoto, J. Y. (2004) Sphingolipid C4 hydroxylation influences properties of yeast detergent-insoluble glycolipid-enriched membranes. *FEBS Lett.* 569:272-276.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. y Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376:660-669.
- Ji, L., Zhang, G., Uematsu, S., Akahori e Hirabayashi, Y. (1995) Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide. *FEBS Lett.* 358:211-214.
- Kenworthy, A. (2002) Peering inside lipid rafts and caveolae. *Trends Biochem. Sci.* 27:435-438.
- Kenworthy, A. K. y Edidin, M. (1998) Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer. *J. Cell Biol.* 142:69-84.
- Koumanov, K. S., Tessier, C., Momchilova, A. B., Dominique, R., Wolf, C. y Quinn, P. J. (2005) Comparative lipid analysis and structure of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes. *Arch. Biochim. Biophys.* 434:150-158.

- Kurzchalia, T. V. y Parton, R. G. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:424-431.
- Lafont, F., Abrami, L. y van der Goot, F. G. (2004) Bacterial subversion of lipid rafts. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:4-10.
- Laughlin, R. C., McGugan, G. C., Powell, R. R., Welter, B. H. y Temesvary, T. A. (2004) Involvement of rafts like plasma membrane domains of *Entamoeba histolytica* in pinocytosis and adhesion. *Infect. Immun.* 72: 5349-5357.
- Lee, M. C. S., Hamamoto, S. y Schekman, R. (2002) Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H⁺-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277:22395-22401.
- Leitner, D. M., Brown, F. L. H. y Wilson, K. R. (2000) Regulation of protein mobility in cell membranes: a dynamic corral model. *Biophys. J.* 78:125-135.
- Lichtenberg, D., Goñi, F. M. y Heerklotz, H. (2005) Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.* 30:430-436.
- Locher, K., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J. P. y Moras, D. (1998) Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA-receptor: crystal structures of the free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* 95:771-778.
- Loll, P. J. Membrane protein structural biology: the high throughput challenge. *J. Struct. Biol.* 142:144-153.
- Lommerse, P. H. M., Spaink, H. P. y Schmidt, T. (2004) *In vivo* plasma membrane organization: results of biophysical approaches. *Biochim. Biophys. Acta* 1664:119-131.
- Lynch, D. V. (1999) Enzymes of sphingolipid metabolism in plants. *Methods Enzymol.* 311:130-149.
- Lynch, D. V. y Steponkus, P. L. (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol.* 83:761-767.
- Majewska-Sawka, A. y Nothnagel, E. A. (2000) The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol.* 122:3-9.
- Mañes, S., del Real, G. y Martínez-A., C. (2003) Pathogens: raft hijackers. *Nature Rev. Immunol.* 3:557-568.
- Marmagne, A., Rouet, M-A., Ferro, M., Rolland, N., Alcon, C., Joyard, J., Garin, J., Barbier-Brygoo, H. y Ephritikhine, G. (2004) Identification of new intrinsic proteins in *Arabidopsis* plasma membrane proteome. *Mol. Cell. Proteomics* 7:675-691.

- Martin, S. W., Glover, B. J. y Davies, J. M. (2005) Lipid microdomains-plant membranes get organized. *Trends Plant Sci.* 10:263-265.
- Mas, A., Navarro-Pedreño, J., Cooke, D. T. y James, C. S. (1994) Characterization and lipid composition of the plasma membrane in grape leaves. *Phytochemistry* 35:1249-1253.
- Merrill, Jr. A. H. (2002) De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* 277:25843-25846.
- Merrill, Jr., Schmelz, E-M., Dillehay, D. L., Spiegel, S., Shayman, J. A., Schroeder, J. J., Riley, R. T., Voss, K. A. y Wang, E. (1997) Symposium Sphingolipids-the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142: 208-225.
- Miceli, M. C. (2001) Introduction. *Immunology* 13:85-87.
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J-P., Hartmann, M-A., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R. y Bessoule, J-J. (2004) Lipid rafts in higher plant cells. *J. Biol. Chem.* 279:36277-36286.
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: Elusive or illusive? *Cell* 115:377-388.
- Nelson, P. E. (1992) Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathology* 117:29-36.
- Nelson, P. E. (1993) Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Phytopathology* 31:233-252.
- Ng, C. K.-Y., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B. y Hetherington, A. M. (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410:596-599.
- Ng, C. K. Y. y Hetherington, A. M. (2001) Sphingolipid-mediated signaling in plants. *Ann. Bot-London* 88:957-965.
- Nühse, T. S., Stensballe, A., Jensen, O. N. y Peck, S. C. (2004) Phosphoproteomics of the *Arabidopsis* plasma membrane and a new phosphorylation site database. *Plant Cell* 16:2394-2405.
- Ohlrogge, J. y Browse, J. (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7:957-970.
- Okada, T., Fujiyoshi, Y., Silow, M., Navarro, J. y Landau, E. M. (2002) Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:5982-5987.
- Olsson, M., Nilsson, R., Norberg, P., von Arnold, S. y Liljenberg, C. (1994) Maturation in Norway spruce: alterations in lipid composition. *Plant Physiol. Biochem.* 32:225-232.

- Palczewski, K., Kumasawa, T., Hori, T., Behnke, C. A. y Motoshima, H. (2000) Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-745.
- Packer, L. y Douce, R. (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* 148:542-570.
- Palmgren, M. G. (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:817-845.
- Pebay-Peyroula, E. y Rosenbusch, J. P. (2001) High-resolution structures and dynamics of membrane protein-lipid complexes: a critique. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:427-432.
- Peskan, T., Westermann, M. y Oelmüller, R. (2000) Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur. J. Biochem.* 267:6989-6995.
- Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83:346-356.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E-L., Simons, K. y Hörber, J. K. H. (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 148:997-1007.
- Resource Center for Sociology, History and Philosophy in Science Teaching (SHiPS Resource Center). Página web: <http://www1.umn.edu/ships/membrane.htm>
- Riley, R. T., Wang, E. y Merrill, A. H. Jr. (1994) 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.* 77:533-540.
- Sánchez-Nieto, S., García-Rubio, O., Pacheco-Moisés, F., Carballo, A., Rodríguez-Sotres, R. y Gavilanes-Ruíz, M. (1997) Purification of plasma membrane from dry maize embryos. *Physiol. Plant.* 101:157-164.
- Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F. y Rabilloud, T. (2000) Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* 21:3329-3344.
- Schägger, H. y von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
- Schaller, A. y Oecking, C. (1999) Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* 11:263-272.

- Schrick K., Fujioka, S., Takatsuto, S., Stierhof, Y-D., Stransky, H., Yoshida, S. y Jurgens, G. (2004) A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and cellulose in *Arabidopsis*. *Plant J.* 38:227-243.
- Schütz, G. J., Kada, G., Pastushenko, V. P. y Schindler, H. (2000) Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* 19:892-901.
- Shaollari, B., Peskan-Berghöfer, T. y Oelmüller, R. (2004) Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. *Physiol. Plant.* 122:397-403.
- Shima, T., Nada, S. y Okada, M. (2003) Transmembrane phosphoprotein Cbp senses cell adhesion signaling mediated by Src family kinase in lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:14897-14902.
- Simons, K. e Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Simons, K. y Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1:31-39.
- Simons, K. y Vaz, W. L. C. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33:269-295.
- Singer, J. S. (2004) Some early history of membrane molecular biology. *Annu. Rev. Physiol.* 66:1-27.
- Sperling, P. y Heinz, E. (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1632:1-15.
- Sondergaard, T. E., Schulz, A. y Palmgren, M. G. (2004) Energization of transport processes in plant. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 136:2475-2482.
- Soriano, J. M., González, L. y Catalá, A. I. (2005) Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B₁. *Prog. Lipid Res.* 44:345-356.
- Stallaert, V. M. y Geuns, J. M. C. (1994) Phospholipid and free sterol composition of hypocotyl plasma membranes of ageing mung bean seedlings. *Phytochemistry* 36:1177-1180.
- Steven, A. C., Ten, H. B., Müller, R., Kistler, J. y Rosenbusch, J. P. (1977) Ultrastructure of a periodic protein layer in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Cell Biol.* 72:292-301.
- Sze, H., Li, X. y Palmgren, M. G. (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11:677-689.
- Tanaka, N., Fujita, M., Handa, H., Murayama, S., Uemura, M., Kawamura, Y., Mitsui, T., Mikami, S. Tozawa, Y., Yoshinaga, T. y Komatsu, S. (2004) Proteomics of the rice cell:

systematic identification of the protein populations in subcellular compartments. *Mol. Gen. Genomics* 271:566-576.

Thurston, G., Regan, S., Rampitsch, C. y Xing, T. (2005) Proteomic and phosphoproteomic approaches to understand plant-pathogen interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66:3-11.

Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, A., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. y Yoshikawa, S. (1996) The whole structures of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution. *Science* 272:1136-1144.

van Blitterswijk, W. J., van der Meer, B. W. y Hilkmann, H. (1987) Quantitative contributions of cholesterol and the individual classes of phospholipids and their degree of fatty acyl (un)saturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarization. *Biochemistry* 26:1746-1756.

van der Goot, G. F. y Harder, T. (2001) Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Immunology* 13:89-97.

van der Goot, F. G., Tran van Nhieu, G., Allaoui, A., Sansonetti, P. y Lafont, F. (2004) Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism. *J. Biol. Chem.* 279:47792-47798.

van Meer, G. y Lisman, Q. (2002) Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J. Biol. Chem.* 277:25855-25858.

Varma, R. y Mayor, S. (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394:798-801.

Vereb, G., Szollosi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Mátyus, L., Waldmann, T. A. y Damjanovich, S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8053-8058.

Voet, D. y Voet, J. G. (1990) *Biochemistry*. 1ª Edición. John Wiley and Sons. New York pp. 271-315.

Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C. y London, E. (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). *J. Biol. Chem.* 276:33540-33546.

Zhang, G., Slaski, J. J., Archambault, D. J. y Taylor, G. J. (1997) Alteration of plasma membrane lipids in aluminum-resistant and aluminum-sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress. *Physiol. Plant.* 99:302-308.