



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETECCIÓN ISOTÓPICA DE
BASES DE CADENA LARGA
EN TEJIDOS VEGETALES QUE
EXPRESAN RESPUESTAS DE
DEFENSA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

NOMBRE DEL ALUMNO

QUETZALCOATL ESCALANTE COVARRUBIAS

TUTOR(A)

DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Martha Juana Martínez Gordillo

Vocal: Aída Nelly García Argáez

Secretario: Marina Gavilanes Ruíz

Suplente: Rocío Cruz Ortega

Suplente: Patricia Guevara Fefer

Lugar donde se desarrolló el tema:

Lab. 101 Depto. de Bioquímica,

Facultad de Química, UNAM

Asesor: _____

Marina Gavilanes Ruíz

Supervisor técnico: _____

M. en C. Mariana Saucedo García

Sustentante: _____

Quetzalcoatl Escalante Covarrubias

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, en el laboratorio 101 Dpto. de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, y bajo la supervisión técnica de la MC Mariana Saucedo García.

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

Quetzalcoatl Escalante Covarrubias realizó esta tesis gracias al proyecto del Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” (Coordinación de Superación Académica) de la Facultad de Química.

Este trabajo fue financiado por el proyecto DGAPA, UNAM (IN207806)

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos de la Facultad de Ciencias con quienes me formé como Biólogo y como persona y a compañeros de vida que me han acompañado durante todos mis procesos sin olvidarme de los que ya no están.

A mi familia que siempre ha estado cerca de mi, sobre todo a mis tías y a mis hermanas.

Generalmente siempre se le agradece al asesor del trabajo, pero esto va en serio, gracias Marina.

Le dedico esta tesis a mi madre que ha trabajado tanto o más que yo para la obtención de este título, y a su entereza para vencer el cáncer.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas

1. RESUMEN 1

2. INTRODUCCIÓN 2

2.1. Esfingolípidos 2

2.1.1. Estructura y diversidad 2

2.1.2. Síntesis y degradación 3

2.1.3. El papel estructural y funcional de los esfingolípidos 4

2.1.4. Esfingolípidos en plantas 5

2.1.4.1. Señalización celular 6

2.1.4.2. Influencia en la respuesta de estrés por frío 7

2.1.4.3. Reacción ante patógenos 7

2.1.4.4. Muerte celular programada 7

2.2. Cinasas de proteínas 8

2.2.1. Estructura 9

2.2.2. Mecanismo de acción 9

2.2.3. La superfamilia cinasa en eucariontes 10

2.3. Cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPCinasas) 11

2.3.1. Cascadas de señalización de las MAPCinasas 12

2.3.2. Inactivación de las cascadas de MAPCinasas 12

2.3.3. Los integrantes de las cascadas de MAPCinasas en plantas 13

2.3.3.1. MAPKKK 13

2.3.3.2. MAPKK 13

2.3.3.3. MAPK 13

2.3.4. Función de las MAPCinasas en organismos vegetales 14

2.3.4.1. División celular 14

2.3.4.2. MAPCinasas y su relación con hormonas vegetales 14

2.3.4.3. Respuesta a estrés abiótico 14

2.3.4.4. Respuesta ante patógenos 14

2.4. La interacción planta-patógeno 15

2.4.1. El ataque de los patógenos 15

2.4.1.1. Virus 16

2.4.1.2. Bacterias 16

2.4.1.3. Hongos	17
2.4.2. Formas de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos	19
2.4.2.1. Genes R	20
2.4.2.2. Metabolitos secundarios	21
2.4.2.3. Muerte celular programada (PCD)	21
3. ANTECEDENTES INMEDIATOS	23
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVO GENERAL	25
5.1. Objetivos particulares.	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1. Material biológico	26
6.2. Exposición de tejidos vegetales a L-[³ H (G)] serina y Fumonisina B ₁	26
6.2.1. Imbibición de embriones de <i>Zea mays</i>	26
6.2.2. Infiltración en <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
6.3. Determinación del incremento en peso húmedo y el crecimiento radicular	27
6.4. Homogeneización del tejido	27
6.5. Cuantificación de proteína por el método de Bradford	28
6.6. Extracción lipídica	28
6.6.1. Técnica de Folch (Folch <i>et al.</i> , 1957)	28
6.6.2. Técnica de hidrólisis básica (Markham, 2006)	29
6.6.3. Técnica para BCL provenientes del tejido total (Markham <i>et al.</i> , 2006)	29
6.7. Separación e identificación por CCF de intermediarios de la síntesis <i>de novo</i> de esfingolípidos marcados y no marcados con L-[³ H (G)] serina	29
6.7.1. Técnica de revelado con Cu	30
6.7.2. Técnica de revelado con ninhidrina	30
6.7.3. Revelado de la placa de CCF por autoradiografía	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Imbibición de embriones de <i>Zea mays</i>	31
7.1.1. Cinética de toma de agua y crecimiento radicular en diferentes condiciones de germinación	31

7.1.2. Establecimiento de las condiciones de imbibición de los embriones y de la captación de L-[³ H-(G)] serina	33
7.1.3. Obtención de homogenados	33
7.2. Extracción lipídica de tejidos vegetales	34
7.2.1. Rendimiento de la extracción lipídica a partir de diferentes cantidades de tejido	34
7.2.2. Comparación entre los métodos de Folch, hidrólisis básica y Markham	35
7.3. Análisis de compuestos esfingoideos en cromatografía en capa fina	36
7.3.1. Curva de aplicación del extracto lipídico a CCF	36
7.3.2. Adecuación de la fase móvil	37
7.3.3. Técnicas de revelado	39
7.4. Perfil de intermediarios de la biosíntesis <i>de novo</i> de esfingolípidos	39
7.4.1. Tiempo de exposición a L[³ H (G)] serina de los embriones de maíz	39
7.4.1.1. Con respecto a la germinación	39
7.4.1.2. Con respecto al metabolismo de esfingolípidos	40
7.4.2. Infiltración de L[³ H (G)] serina en <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
7.4.3. Selección de la concentración de L[³ H (G)] serina infiltrada en los tejidos vegetales	42
7.4.4. Cuantificación isotópica de L[³ H (G)] serina en los extractos lipídicosn	44
7.5. Identificación de compuestos esfingoideos de embriones de maíz expuestos a L[³ H (G)] serina	44
7.5.1. Detección de BCL por tinción con ninhidrina	44
7.5.2. Identificación de BCL en ensayos con miriocina	45
7.5.3. Identificación de BCL por (CLAR)	46
7.5.4. Identificación de compuestos esfingoideos radiactivos por la exposición de placas cromatográficas a autorradiografía	47
7.6. Efecto de la FB ₁ en la biosíntesis <i>de novo</i> de esfingolípidos	48

8. DISCUSIÓN 52

8.1. Condiciones para el ensayo de marcaje radiactivo de los intermediarios de la síntesis de esfingolípidos en embriones de *Zea mays* en

germinación 52

8.2. Condiciones para la extracción de esfingolípidos y para su separación cromatográfica 53

8.3. Marcaje radiactivo de intermediarios de la ruta de biosíntesis *de novo* de esfingolípidos 54

8.4. Identificación de compuestos esfingoideos detectados en autorradiografía 57

8.5. El efecto de la FB₁ en la síntesis *de novo* de esfingolípidos 58

8.7. Relación entre la cinética de acumulación de esfingolípidos sintetizados *de novo* y la activación de MAPquinas por efecto de la FB₁ 60

9. CONCLUSIONES 62

10. BIBLIOGRAFÍA 63

APÉNDICE I. Métodos de análisis de esfingolípidos 68

APÉNDICE II. Compuestos utilizados 70

LISTA DE ABRVIATURAS

ABA	Ácido abcícico
acd5	Accelerated cell death 5, gen que codifica a la proteína ACD5
acd11	Accelerated cell death 11, gen que codifica a la proteína ACD11
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BCL	Bases de cadena larga
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CoA	Coenzima A
Em	esfingomileina
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ES	esfinganina
FB ₁	Fumonisina B ₁
Fser	fosfatidil serina
HR	Respuesta de hipersensibilidad
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MAPKK	Proteína cinasa cinasa activada por mitógeno
MAPKKK	Proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógeno
PCD	Muerte celular programada
PS	fitoesfingosina
RE	Réticulo endoplásmico
SO	esfingosina

1. RESUMEN

Los esfingolípidos son componentes membranales derivados del aminoalcohol esfinganina, que al unirse por enlace amida a un ácido graso forma la ceramida, misma que origina esfingolípidos complejos del tipo de las esfingomielinas, los glicosfingolípidos o los gangliósidos. Los efectos ligados a cambios en los niveles endógenos de esfingolípidos o de sus precursores han sido asociados a condiciones en las que se presentan respuestas de defensa en plantas.

La fumonisina B₁ (micotoxina producida por el hongo patógeno *Fusarium verticillioides*) causa la inhibición de la actividad de la esfinganina N-aciltransferasa (enzima que cataliza el tercer paso de la vía de formación de esfingolípidos complejos), produciendo una acumulación de bases de cadena larga (BCL). Tal acumulación se ha asociado a respuestas de defensa en plantas, como las de un aumento en: la degradación de DNA, la producción de ácido salicílico, la transcripción de genes de defensa, la formación de especies reactivas de oxígeno, la inmunidad a un patógeno avirulento, la muerte celular programada producida durante la respuesta de hipersensibilidad (HR) y la activación de MAPcinasas.

En el presente trabajo, se estableció un sistema que permitiera conocer la cinética de acumulación de esfingolípidos sintetizados *de novo* en embriones de maíz expuestos a FB₁ entre 0.5 y 12 h, intervalo en el que se ha observado la activación de MAPcinasas ligadas a reacciones de defensa. Para ello, los embriones fueron expuestos a L-[³H (G)] serina antes de la exposición a FB₁. Posteriormente, se extrajeron los lípidos de cada uno de los tiempos probados para separarse e identificarse por cromatografía en capa fina; la placa fue expuesta a película de autorradiografía para observar la marca radioactiva presente en los lípidos extraídos. La exposición a 40 μM de FB₁ causó la acumulación de fitoesfingosina y esfingosina con respecto al control a las 2 y 4 h, respectivamente, y una BCL putativa con Rf. de 0.25, que no logró ser identificada por medio de los estándares comerciales existentes, se acumuló a las 2, 4 y 12 h.

Estos datos indican que la FB₁ produce una acumulación en los niveles endógenos de BCL, observándose coincidencias entre los cursos de tiempo de la acumulación de BCL y de activación de MAPK, promovidos en ambos casos por la exposición a FB₁, por lo que el presente trabajo apoya la relación entre el aumento en los niveles de BCL y la activación de MAPcinasas, estableciendo así, una evidencia más que asocia a los esfingolípidos como mediadores de reacciones de defensa en plantas

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Esfingolípidos

Las formas de vida en la tierra han pasado a través de una serie intrincada de sucesos evolutivos que las han ido perfeccionando para adecuarse exitosamente con respecto a su medio ambiente. Uno de los acontecimientos clave que contribuyeron a su consolidación fue el desarrollo de estructuras responsables de delimitar a la célula de su medio externo, es decir la formación de moléculas que, agrupándose en arreglos cristalinos hicieron posible diferenciar el ambiente externo del medio interno celular para así aumentar su estabilidad. La membrana plasmática en un principio fue un producto de interacciones físicas y químicas existentes en las condiciones en las que apareció la vida, pero su perfeccionamiento ha sido un largo proceso en el que se han visto implicados diversos linajes moleculares (proteínas, esteroides y glicolípidos). Dentro de esta variedad molecular, los esfingolípidos son componentes fundamentales de las membranas biológicas, ya que juegan importantes papeles celulares relacionados con la estructura y la señalización celular.

2.1.1. Estructura y diversidad

La esfinganina es un alcohol aminado de cadena hidrocarbonada larga (2-amino-1,3 hidroxialcano), considerada como la base de cadena larga (BCL) básica estructural de los esfingolípidos (Merrill *et al.*, 1997). Existe una gran diversidad de BCL que pueden formar parte de la estructura de un esfingolípidos, consistentes en variaciones estructurales de la esfinganina que difieren en el número y la posición de hidroxilaciones e insaturaciones. Las últimas generalmente se encuentran entre los C₄ y C₅ ó entre los C₈ y C₉ (Sperling y Heinz, 2003). Una de las subestructuras cruciales en la formación de esfingolípidos es la esfingosina, una BCL que se diferencia de la esfinganina por una insaturación entre el C₄ y C₅.

Cuando la esfinganina se encuentra N-acilada en el grupo amino por un ácido graso de 14 a 26 átomos de carbono, se forma la ceramida, que dependiendo del tipo de ácido graso al que se encuentre unida, da lugar a una gran variedad de estructuras, ya que estos ácidos grasos pueden contener insaturaciones e hidroxilaciones a lo largo de la cadena. La combinatoria resultante de las posiciones y el número de dobles enlaces e hidroxilaciones, -más la longitud del ácido graso- da como resultado una gran variedad de moléculas bien diferenciadas en cuanto a propiedades y estructura (Sperling y Heinz, 2003).

La ceramida es un lípido que por sí mismo se encuentra en grandes proporciones dentro de

la célula y desempeña funciones importantes para ésta, pero de la ceramidas pueden derivarse aún otra clase de lípidos de mayor complejidad estructural, éstos son los denominados esfingolípidos complejos y están clasificados según sus propiedades estructurales en tres grupos: esfingomielinas, glucoesfingolípidos y gangliósidos (Huwiler *et al.* 2000). Las esfingomielinas están conformadas por una ceramida, a la que se le une en el OH del C₁ -por enlace éster- y una fosfocolina o fosfoetanolamina que constituye el grupo de cabeza polar (Huwiler *et al.*, 2000).

Los glucoesfingolípidos se diferencian por tener uno o más azúcares en su grupo polar, unidos al OH del C₁. A su vez, están integrados por cerebrósidos -con un único azúcar unido a la ceramida- y por globósidos, glucoesfingolípidos neutros con dos o más azúcares unidos a la ceramida.

Los gangliósidos son considerados los lípidos más complejos de esta familia, ya que al tener cabezas polares formadas por oligosacáridos y uno o varios glúcidos terminales de ácido siálico, son moléculas considerablemente pesadas y estructuralmente diversas (Huwiler *et al.*, 2000).

Todas estas estructuras, como se observa en la Figura 1, resultan muy heterogéneas entre sí -a causa de la LCB que las conforma, el tipo de ácido graso unido al grupo amino de la LCB y la gran diversidad de cabezas polares que pueden caracterizar a un grupo u otro- y existen funcionalmente dentro de las células, por lo que el número de estructuras resultantes es muy elevado y obviamente esta variedad se encuentra relacionada directamente con las diferentes labores que llevan estas moléculas dentro de la célula.

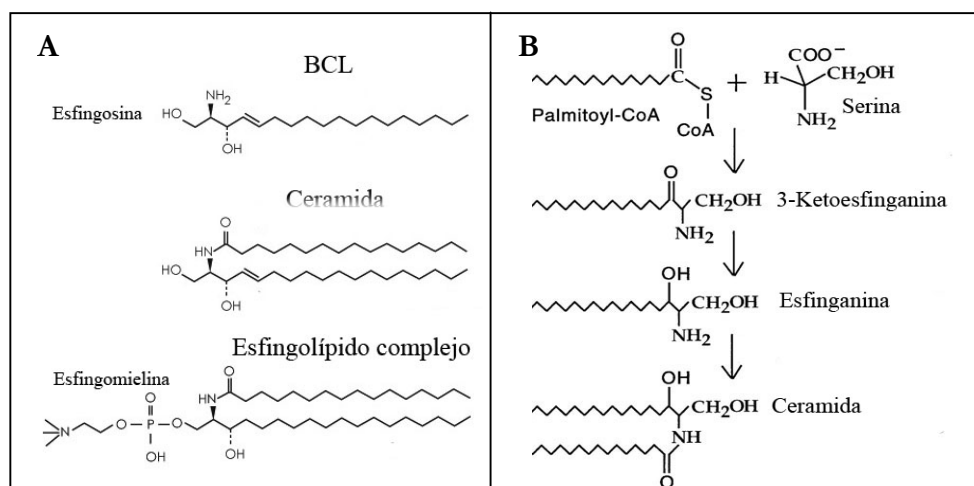


Figura 1. Estructura y síntesis de esfingolípidos. A) Estructura de diferentes especies de esfingolípidos y B) Ruta de biosíntesis *de novo* de esfingolípidos hasta la formación de la ceramida.

2.1.2. Síntesis y degradación

La biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos tiene lugar en el retículo endoplásmico (RE) y en el aparato de Golgi. Comienza con la reacción entre la L-serina y un ácido graso de 16 carbonos, unido a un acil coenzima A (CoA): el palmitoil-CoA. La unión de estos dos compuestos está mediada por la enzima serin palmitoil transferasa (SPT), que une el C₁ de la serina al C₁ del palmitoil-CoA, dando como resultado la formación de 3-cetoesfinganina y la liberación de una molécula de CO₂ más otra molécula de CoA. Posteriormente la 3-cetoesfinganina, que es reducida por la enzima 3-cetoesfinganina reductasa en una reacción dependiente de NADPH, dando como resultado la liberación de NADP⁺ y la formación de la esfinganina. A la ruta se incorpora la enzima esfinganina N-aciltransferasa o ceramida sintasa -responsable de la N-acilación de la esfinganina- y un ácido graso de 14 a 26 átomos de carbono, que dan como resultado la formación de la ceramida; la ceramida sintasa es inhibida por la fumonisina B₁ (FB₁) por inhibición competitiva, debido al alto grado de analogía estructural existente entre la FB₁ y las bases de cadena larga (BCL), que son el sustrato de la ceramida sintasa. El efecto de esta inhibición produce escasez en los niveles de ceramidas y esfingolípidos complejos y una acumulación de BCL (Huwiler *et al.*, 2000). Dado que la formación de todos los intermediarios de la ruta hasta la formación de la ceramida se lleva a cabo en el RE, todas las enzimas responsables de la formación de los diferentes compuestos también se encuentran en esta estructura, si bien se localizan en el lumen, la membrana o en una cara de ella (Merrill *et al.*, 1997).

Todos los esfingolípidos complejos comparten la misma ruta biosintética hasta la formación de la ceramida, y desde aquí divergen en los pasos posteriores en cuanto a los intermediarios y las enzimas responsables de sintetizar esfingomielinas y glucolípidos. La adición de la parte polar a la ceramida ocurre generalmente en el Aparato de Golgi.

La enzima esfingomielina sintasa se encuentra en el Aparato de Golgi y es la responsable de catalizar la reacción que produce la formación de esfingomielinas; por lo tanto, la ceramida sintetizada en el RE debe viajar a través del espacio entre el RE y el Aparato de Golgi para hallar a la esfingomielina sintasa, responsable de agregarle un grupo polar conformado por fosfocolina o fosfoetanolamina a su grupo OH₁ libre.

La síntesis de glucolípidos requiere la formación de un intermediario citosólico: la glucosilceramida, sintetizada por la glucosiltransferasa, enzima que únicamente se halla en el

citósol, muy cercana al Aparato de Golgi (Schmelz *et al.* 2001). Después, la glucosil ceramida es introducida al Aparato de Golgi, en el que son sintetizadas las múltiples especies de glucolípidos por la adición de mono u oligosacáridos con intermediarios y enzimas específicas para cada tipo particular de glucolípido.

Con respecto a la degradación de los esfingolípidos, ésta tiene lugar en compartimientos celulares especializados para la degradación. Los endosomas y los lisosomas proveen un entorno ácido que favorece la degradación a base de hidrolasas en cooperación con proteínas encargadas de solubilizar las partes apolares lipídicas (Imai *et al.*, 1997). Las esfingomielinas y los glucoesfingolípidos son degradados generando de manera casi inversa a sus intermediarios de síntesis, pero sin compartir las enzimas que participan en su formación.

Una vez que estos compuestos han entrado a la vía de degradación pueden ser totalmente desensamblados o bien pueden quedar en la forma de algún intermediario y actuar como señalizadores, como en el caso de la ceramida que participa como señalizador para la biosíntesis de glucosil ceramida o bien pueden entrar nuevamente a la ruta de síntesis, siendo éste un paso alternativo para la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos.

2.1.3. El papel estructural y funcional de los esfingolípidos

Si tomásemos cualquier célula y la analizáramos parte por parte, notaríamos inmediatamente que uno de los compuestos más abundantes que posee son los esfingolípidos (Lynch, 2000). La membrana plasmática de algunas células eucariontes posee una proporción del 20 al 35% (dependiendo de la especie y el tipo celular) con respecto al resto de sus componentes (Van Meer y Lisman, 2002). También se sabe que la cara externa de la bicapa lipídica que conforma a la membrana tiene una proporción mayor de esfingolípidos y una proporción menor en la cara interna con respecto a los demás componentes celulares (Bohn *et al.*, 2001). El papel de estos compuestos en las membranas plasmática, nuclear y de los diferentes cuerpos membranosos de la célula, es fundamental desde el punto de vista estructural, ya que según la distribución y la concentración de esfingolípidos, las propiedades de la membrana plasmática se ven afectadas. Un ejemplo de ello es el movimiento de lípidos de una monocapa a su contraparte (flip-flop); este movimiento se ve afectado en altas concentraciones de esfingolípidos, ya que el tiempo que tarda este movimiento (segundos para el diacilglicerol) puede alargarse a horas.

Los esfingolípidos tienen un gran peso estructural dentro de la célula, sin embargo son moléculas tan relevantes que también desempeñan papeles fisiológicos de señalización y como

cofactores; por ejemplo, la ceramida exógena está involucrada en la regulación del programa de muerte celular o apoptosis, ya que activa a miembros de la superfamilia TNF- α que están directamente relacionados con la cascada de señalización que desemboca en muerte celular en mamíferos (Brisdelli *et al.*, 2006, Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994). También se ha ligado a la ceramida con la activación de una cascada señalizadora de MAPKinasas (Yao *et al.* 1985) y con la activación de proteínas fosfatasas (CAPP), que están involucradas en el proceso de apoptosis (Hannun, 1996).

2.1.4. Esfingolípidos en plantas

La vida está diferenciada por linajes que divergen estructural, ecológica y evolutivamente entre sí; tomando en cuenta estas diferencias dentro de un nivel de organización que puede ubicarse a nivel de especie, es de esperarse que a nivel molecular la diferencia se mantenga en ciertos términos dentro de cada especie. El caso concreto de las plantas y las moléculas que ocupan este trabajo refleja de manera ejemplar este caso.

Los esfingolípidos hallados en plantas parecen realizar un conjunto de tareas similares a las observadas en otras especies eucariontes (levaduras y animales). Existen algunas moléculas que pueden diferenciarse tanto estructural como funcionalmente; ejemplo de ello es la proporción de algunos de estos compuestos: los isómeros 8-(E) y 8-(Z) de la esfínga-4,8-dienina y la 4-hidroxi-esfínga-8-enina son las bases más recurrentes que se presentan en los cerebrósidos de plantas a comparación de la 4-hidroxi-esfínganina, que es la BCL más abundante en animales y en *Saccharomyces cerevisiae* (Sperling y Heinz, 2003); en mamíferos, la BCL más abundante es la (E)-esfínga-4-enina (esfingosina, (d18:1⁴), en *S.cerevisiae* la base predominante es la 4-hidroxi-esfínganina (fitoesfínganina, t18:0). En contraste, las BCL en plantas son mucho más variables, las bases más comunes son la fitoesfínganina, la esfingosina y sus respectivos derivados, que varían predominantemente en la posición y el acomodo cis o trans de la BCL del C₈. (Kawaguchi *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que las tareas que desempeñan los esfingolípidos en plantas incluyen la señalización celular, la estabilidad de la membrana, las respuestas al estrés y recientemente se ha sugerido un papel ligado a la patogénesis y la apoptosis (Ng y Hetherington, 2001).

2.1.4.1. Señalización celular

Los esfingolípidos son importantes señalizadores celulares bien establecidos en levaduras y

mamíferos. Tomando a *Arabidopsis thaliana* como modelo, en plantas se ha descrito que la disminución en la cantidad de una proteína que transporta a la (E)-esfinga-4-enina está asociada a la muerte celular (Kawaguchi *et al.*, 2000) y se ha propuesto que la esfinga-4-enina-1-fosfato promueve el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana celular. De igual modo, se ha reportado que el cambio en los niveles endógenos de esfingosina-1-fosfato promueve la apertura y cierre de estomas, lo cual asocia a esta molécula con la transducción de señales promovida por el ácido abscísico e implicada en la reducción del turgor de las células guarda (Ng *et al.*, 2001).

2.1.4.2. Influencia en la respuesta de estrés por frío

Se ha observado que una menor concentración de glucosil ceramida en la membrana plasmática favorece la resistencia a temperaturas bajas (Lynch *et al.*, 1987). Algunas características singulares de cerebrósidos con insaturaciones e hidroxilaciones en el ácido graso, promueven una resistencia menor al frío que aquellas plantas que carecen de insaturaciones e hidroxilaciones en los residuos del ácido graso (Imai *et al.* 2000). Otras evidencias sugieren que altos niveles de (E/Z)-4-hidroxiesfinganina-8-enina están correlacionados con la tolerancia al frío (Kawaguchi *et al.*, 2000).

2.1.4.3. Reacción ante patógenos

Al ser componentes integrales de la membrana plasmática en células de plantas, los esfingolípidos son candidatos a una interacción que pudiesen tener las células en contacto con patógenos. Efectivamente, se ha encontrado que los niveles de RNAm de la enzima SPT (responsable del primer paso de la biosíntesis de esfingolípidos), se incrementan durante la respuesta de hipersensibilidad (HR) en variedades resistentes de *Solanum tuberosum* infectadas por el hongo *Phytophthora infestans* (da Silva *et al.*, 2006), lo cual establece una posible asociación entre la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos y las cascadas que se activan dentro de la célula, quizá dando lugar a una respuesta de defensa regulada por esfingolípidos. También se ha demostrado que los cerebrósidos A y C (glucoesfingolípidos) producidos por diversos fitopatógenos inducen síntesis de fitoalexinas, un aumento en la transcripción de proteínas de defensa (proteínas PR), la expresión de la HR y la resistencia a infecciones subsecuentes por patógenos en *Oryza sativa* (Koga *et al.*, 1998; Umemura *et al.*, 2000).

2.1.4.4. Muerte celular programada

Los niveles de ceramida y BCL están íntimamente relacionados con la apoptosis. Se ha

observado que la acumulación de dihidroesfingosina y 3-cetodihidroesfingosina inducen la muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés), el cual puede ser revertido por la adición de ceramida, por lo que el balance de ceramida y sus derivados fosforilados probablemente sean moduladores de la PCD (Worral *et al.*, 2003). Otro ejemplo es el de la ceramida C₂ que induce muerte por apoptosis, mientras su derivado fosforilado la bloquea. Estos antecedentes apoyan el papel de la ceramida y de su fosforilación en la regulación de la muerte celular en plantas (Liang *et al.*, 2003).

La exposición de organismos vegetales a las micotoxinas FB₁ y (AAL, análogo estructural de la FB₁), producidas por los hongos *Fusarium verticillioides* y *Alternaria alternata*, respectivamente, es uno de los sistemas más utilizados en el estudio de los esfingolípidos como mediadores de la PCD (Shah, 2005). La muerte celular inducida por la FB₁ y la toxina AAL está asociada a la acumulación de BCL provocada por la disrupción del metabolismo de esfingolípidos vía la inhibición de la esfinganina N-aciltransferasa producida por las toxinas fúngicas (Abbas *et al.*, 1994). La mutante accelerated cell death 5 (acd5, que codifica una supuesta ceramida cinasa de *A. thaliana*) (Greenberg, 2000) y la mutante accelerated cell death 11 (acd11, que codifica a una proteína que acelera el transporte de esfingosina entre organelos membranosos) (Broderson, 2002) producen la expresión de una PCD precoz en presencia de patógenos debida a la acumulación de BCL, por la interrupción de la actividad de la ceramida cinasa y por la regionalización en ciertos sectores celulares de la esfingosina que surge como producto de la inactivación de la proteína ACD11 (Liang *et al.*, 2003).

2.2. Cinasas de proteínas

La interacción entre la célula y su medio externo e interno está estrictamente regulada por señalizadores intracelulares altamente especializados que reciben, transducen y/o amplifican los estímulos celulares con el propósito de generar respuestas adecuadas al estímulo recibido. Estos sistemas transductores son cruciales para la homeostasis, ya que en ausencia de la señalización celular, el equilibrio dinámico, dado por la estabilidad fisiológica del medio interno, simplemente no existiría.

Las cinasas de proteína constituyen una superfamilia de señalizadores intracelulares implicados en tareas como: expresión genética, crecimiento celular, motilidad celular, diferenciación celular y división celular (Johnson *et al.*, 1996). La transducción de señales mediada por cinasas se lleva a cabo gracias a la transferencia de un fosfato provenientes del ATP (ó GTP), unido en primera instancia a residuos de serina, tirosina o treonina -localizados

en el segmento de activación de las cinasas-, para posteriormente ser transferido al sustrato que debe ser fosforilado (proteínas, azúcares, nucleótidos o intermediarios metabólicos) (Adams *et al.*, 2001).

2.2.1. Estructura

A partir de la cristalización de algunos miembros de la superfamilia de cinasas como la Cdk2 (De Bondt *et al.*, 1993), Erk2 (Zhang *et al.* 1994), cinasas de caseína-1 (Carmel *et al.*, 1994) y del sitio catalítico de la cinasa PKA-Ca (Hanks y Hunter 1995), se ha logrado establecer un consenso estructural para describir de forma general la estructura moleculuar de las cinasas.

Dichas enzimas están codificadas por una sola cadena polipeptídica con una longitud que va de los 250 a los 350 residuos de aminoácidos (Hanks y Quinn, 1991). Su secuencia es característica, ya que contienen residuos de treonina, serina ó tirosina, responsables en gran parte, de su función como cinasa y comúnmente localizados en las regiones N terminal ó C-terminal de la secuencia polipeptídica (Hanks y Hunter, 1995). Las cinasas poseen doce subdominios altamente conservados a lo largo de toda la familia (Zhang *et al.*, 1994).

Tanto las estructuras de α -hélice como de β -plegada se encuentran en la proteína, diferenciándose tres regiones topológico-funcionales dentro del polipéptido. El lóbulo mayor, ubicado en el COOH-terminal, está integrado por los dominios VI-IX, el lóbulo menor, dispuesto en el NH₂-terminal, integrado por los dominios I-IV y el segmento de activación ubicado dentro del lóbulo mayor, en el subdominio VIII. El lóbulo mayor está conformado en gran parte por α -hélices que interactúan entre sí por fuerzas moleculares débiles (puentes de hidrógeno), al contrario del glóbulo menor, que en su mayoría está conformado por hojas β -plegadas. El segmento de activación se observa en la estructura tridimensional como una hendidura localizada entre los dos lóbulos y conforma una de las partes más hidrofóbicas de la molécula (Knighton *et al.*, 1991).

2.2.2. Mecanismo de acción

Cada uno de los subdominios descritos en la Figura 2, juega un papel particular en la función de la cinasa. La actividad de esta enzima comienza con el encuentro entre la cinasa y un nucleótido fosforilado como el ATP. El lóbulo menor está encargado de orientar correctamente a la molécula de ATP ó GTP hacia el sitio activo de la cinasa. La actividad comienza cuando el subdominio I, que contiene la secuencia consenso Gly-x-Gly-x-x-Gly-x-Val, establece puentes de hidrógeno con el nucleótido trifosfatado y así anclarlo a su estructura. El subdominio II refuerza las uniones débiles con el nucleótido y orienta a los fosfatos α y β al

subdominio III, que es el encargado de estabilizar la interacción de los fosfatos al desfosforilar al ATP. El subdominio V, ubicado en el sitio activo, es el responsable del anclaje total del anillo de adenina y el sustrato.

El lóbulo mayor es el encargado de orientar e iniciar la fosforilación del sustrato; para ello comienza su actividad con el subdominio VI-B, que neutraliza la carga negativa del fosfato y del ATP para que su transferencia sea más fácil cuando se lleve a cabo su orientación hacia el aceptor del fosfato por parte del subdominio VII. La tarea del subdominio VIII es regular por medio de la fosforilación la actividad o inactividad de la cinasa para que se inhiba o promueva el reconocimiento y anclaje del sustrato en el segmento de activación. Finalmente, si la cinasa está activa, el segmento de activación lleva a cabo la transferencia del fosfato del ATP o GTP hacia el sustrato (Halks y Hultner, 1995).

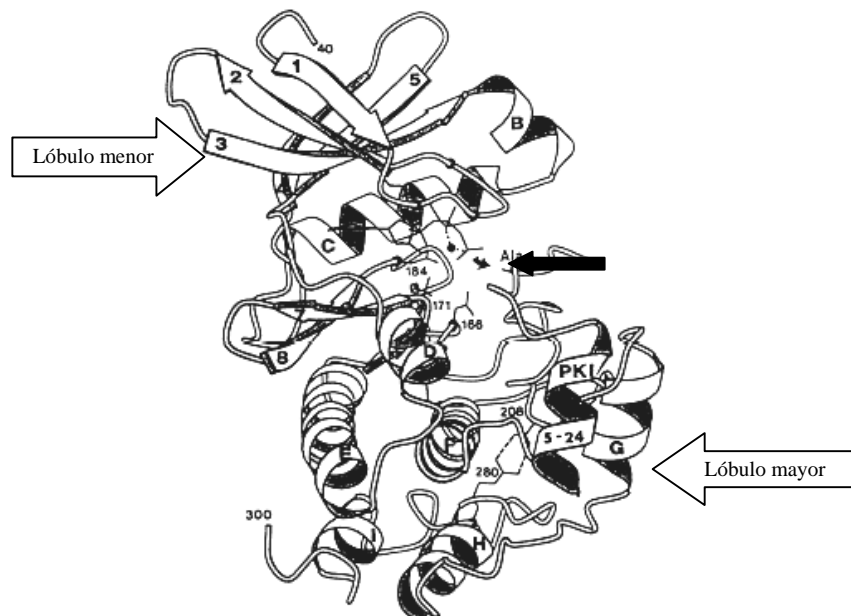


Figura 2. Estructura terciaria del sitio catalítico de la PKA α . El sitio activo de la cinasa está señalado con una flecha negra, mientras que se observa claramente la abundancia de α -hélices en el lóbulo mayor y de β -plegada en el lóbulo menor (modificado de Hanks y Hunter, 1995).

2.2.3. La superfamilia cinasa en eucariontes

La cinasas se hallan en protozoarios, hongos, plantas y mamíferos, organismos en los que hasta el momento, se han logrado estudiar e identificar un gran número de los miembros de la superfamilia de las cinasas. Su análisis sugiere que la familia cinasa se ramificó después de la divergencia entre procariontes y eucariontes (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991), ya que se han identificado proteínas cinasas homólogas entre estos dos dominios (Galyov *et al.*, 1993).

El alineamiento de múltiples secuencias de cinasas provenientes de organismos vertebrados, arroja alrededor de un 95% de similitud, lo cual sugiere que tanto la estructura,

como las funciones de las cinasas se encuentran altamente conservadas y que queda claramente reflejado en su arreglo tridimensional (Hanks y Hunter, 1995). Existen ciertas diferencias estructurales que dividen a las cinasas en diferentes familias. La clasificación de las cinasas en cinco diferentes grupos se ha realizado basándose en la homología entre sus sitios catalíticos: 1) el grupo PTK es una familia de cinasas que hasta el momento sólo se ha detectado en animales y juega importantes papeles de señalización celular, al igual que 2) el grupo ACG, conformado por cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos difosfatados (como el cAMP y el GMP), fosfolípidos y calcio; esta subfamilia se encuentra abundantemente en plantas y se sabe que es regulada por segundos mensajeros (Galyov *et al.*, 1993). Otro grupo está conformado por 3) las RLK, que de acuerdo al dominio exhibido en la cara externa de la célula, pueden unirse a carbohidratos, esteroides o inclusive a microorganismos (Shiu *et al.*, 2001). 4) Las CaMKs o cinasas dependientes de Ca^{++} y calmodulina regulan la activación a respuestas de estrés provenientes de factores abióticos, relacionadas más íntimamente con la regulación nutricional (Galyov *et al.*, 1993). 5) El grupo CMGC incluye algunos subgrupos que actúan en procesos anteriores a la activación de segundos mensajeros, éstos son: cinasas dependientes de ciclinas (CDK), proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPcinasas), cinasas de la glucógeno sintetasa (GSK-3) y la cinasa de caseína II (CKII) (Flores *et al.*, 2005).

2.3. Cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPcinasas)

La transmisión de señales extra e intra celulares está mediada por la interacción entre diversas clases de proteínas, que regulan un gran número de procesos dentro de la célula. En los últimos años, el estudio de las MAPcinasas se ha visto nutrido por un gran número de investigaciones enfocadas a la dilucidación tanto de su mecanismo de acción como de su estructura; así mismo, es cada vez más frecuente relacionar la actividad de las MAPcinasas con un sin número de eventos celulares, en donde fungen como amplificadores y/o transductores de estímulos. Las cascadas de señalización de las MAPcinasas están encargadas de transmitir señales que inician diversos procesos celulares como la diferenciación, la proliferación y el desarrollo (Seger y Krebs, 1995).

El mecanismo de acción de las MAPK está conformado por una serie de módulos de señalización (ubicados en el citoplasma) integrados por proteínas de función específica. Actualmente, se conoce en algunos casos, el mecanismo de acción por el cuál se lleva a cabo la transmisión entre los componentes del módulo que participa en las cascadas y en las que se han estudiado las funciones específicas de las moléculas encargadas de esta vía de señalización.

2.3.1. Cascadas de señalización de las MAPquinasas

Las cascadas de señalización de las MAPquinasas están altamente conservadas en eucariontes (Meskiene y Hirt, 2000), por lo que este proceso puede abordarse de manera general en plantas, animales, hongos y protozoarios. De igual manera, la fosforilación en los residuos de tirosina, serina y/o treonina procede de la misma forma que en el de fosforilación de cinasas de proteína.

La cascada consiste en un módulo conformado por tres clases diferentes de cinasas: MAPKKK, MAPKK y MAPK. El flujo de información comienza con la llegada de un estímulo proveniente del interior o exterior de la célula. La heterogeneidad en la estructura y en los dominios de activación de las diferentes MAPKKK, le confieren a la cascada un amplio rango de posibilidades para responder a diferentes estímulos (Fanger *et al.*, 1997), pero a partir de su recepción, el estímulo transmitido se orienta selectivamente por rutas específicas de señalización.

La señal se transmite a la MAPKKK por medio de la fosforilación de su sitio de activación. El segundo módulo encargado de recibir la señal está integrado por diversas especies de MAPKK, que son activadas por la fosforilación de sus residuos de treonina y tirosina que se encuentran dentro de un motivo conservado entre el dominio VII y VIII (Alessi *et al.*, 1994). En este punto de la cascada, la transducción de la señal se encuentra más restringida, a causa de la alta especificidad que tienen las MAPKK por su sustrato.

Las MAPKK fosforilan a su vez a las MAPK para que la señalización continúe corriente abajo, con el fin de activar factores de transcripción o permanecer en el citoplasma y relacionarse con proteínas asociadas al citoesqueleto. La fosforilación de sus sustratos únicamente se puede llevar a cabo en residuos de treonina y tirosina asociados con residuos de prolina.

2.3.2. Inactivación de las cascadas de MAPquinasas

La inactivación de las MAPquinasas está mediada por la desfosforilación o fosforilación de su motivo Ser -X- Thr en el caso de las MAPKKK y MAPKK o Tyr-X- Thr en el caso de las MAPK ubicado en su segmento de activación. Aquellas proteínas que poseen doble especificidad pueden ser desfosforiladas en los residuos de tirosina o treonina y son denominadas DsPTPasas; las fosfatasa de tirosina únicamente pueden ser desfosforiladas en este residuo, son denominadas PTPasas y finalmente se agrupan en las PPasas aquellas MAP cinasas que tienen función serin/treonina-fosfatasa y que por lo tanto únicamente pueden ser desfosforiladas en estos residuos (Suzuki *et al.*, 1999).

2.3.3. Los integrantes de las cascadas de MAPKinasas en plantas

2.3.3.1. MAPKKK

En plantas, el grupo de las MAPKKK está subdividido de acuerdo a su estructura en 1) las MEKK, conformado por 21 miembros de las PMEKK y por trece miembros del grupo PRAF (Ligterink y Hirt, 2001) y por 2) las PZIK integradas por 11 cinasas que han sido identificadas hasta el momento en *A. thaliana* (Zwerger y Hirt, 2001).

Estos grupos guardan homología con MAPKK analizadas en alfalfa, tabaco y jitomate, en donde su estudio confirma un alto grado de conservación estructural y funcional dentro del grupo y la poca variedad encontrada en el segmento de activación.

Con respecto al mecanismo de acción, éste puede ser generalizado –como ya se ha expuesto– a todos los miembros de las MAPKKK.

2.3.3.2. MAPKK

El análisis del genoma de *A. thaliana* reveló cuatro diferentes grupos: 1) el grupo compuesto por las PMKK1 y PMKK2 integrado por seis cinasas, 2) el grupo PMKK3 con un sólo integrante, y 3) el grupo de las PMKK4 compuesto por tres miembros (Wrzaczek y Hirt, 2001).

Estudios posteriores en otras familias de plantas revelan marcadas homologías con las MAPKK estudiadas en *Arabidopsis*, tal es el caso de *Nicotiana tabacum*, especie en la cual ha sido identificada la SIPK que guarda homología con el grupo de las PMKK1. Cabe mencionar que este hallazgo fue de gran relevancia, ya que se pudo confirmar la acción de las MAPKK en procesos de defensa en plantas, pues la SIPK es activada por ácido salicílico, molécula relacionada en la defensa al ataque de patógenos (Yang *et al.*, 2001).

2.3.3.3. MAPK

Ésta es una de las familias menos estudiadas en plantas, pero su análisis filogenético ha revelado fuertes lazos de homología con respecto a las MAPK de animales llamadas ERK, motivo por el cual, la comprensión de su mecanismo de acción y estructura se ha visto beneficiado. En plantas reciben el nombre de PERKs (Plant ERKs) (Wrzaczek y Hirt, 2001). El empalme de una secuencia de MAPK en el genoma de *Arabidopsis*, reveló 24 diferentes MAPK que fueron colocadas en tres grupos: 1) PERK α 2)PERK β y 3)PERK γ . La agrupación se realizó basándose principalmente en los motivos que caracterizan al segmento de activación; con respecto a esto, el motivo Thr-Glu-Tyr se encuentra invariablemente en todas las PERK α y PERK γ , mientras que las cinasas PERK β poseen el motivo Thr-Asp-Tyr. Las PERK β y PERK γ se diferencian estructuralmente de las cinasas PERK α por contener una cadena de

larga extensión en el C-terminal.

Homólogos de estas cinasas han sido identificados, aunque no plenamente, en otras familias de plantas, lo que ha permitido realizar algunos análisis filogenéticos con los cuales se ha podido dilucidar un proceso de divergencia temprana entre estas proteínas, es decir, la diversificación de MAPK en plantas ocurrió en edades tempranas de su evolución. Éste es un dato relevante para entender la diversidad de tareas a las que responden estas moléculas en organismos vegetales tales como respuestas al estrés biótico y abiótico, la producción de hormonas, el ciclo celular y el desarrollo (Mikoajczyk, 2000).

2.3.4. Función de las MAPcinasas en organismos vegetales

2.3.4.1. División celular

Las primeras evidencias de la participación de las MAPK en el ciclo celular -particularmente en el periodo de división celular en plantas-, consistieron en la inhibición de cinasas que producían el bloqueo de la mitosis (Katsuta y Shibaoka, 1992). También se observó que la eliminación del fósforo en las células provocaba un arresto en la fase G₁; la relación fue casi obvia, ya que al carecer de fósforo, las cinasas no pueden llevar a cabo su actividad. Posteriormente al medir los niveles de transcritos de MAPcinasas se observó un aumento considerable en la fase G₁. Asimismo, se midieron los transcritos correspondientes a la MAPcinasa BnMAP4K1 y 2, observándose una expresión de genes dependiente de la entrada a G₂ (Leprince *et al.*, 1999). De igual manera, al medir transcritos de células en suspensión de tabaco, se observó un aumento en los transcritos de las MAP3K durante la fase log, que corresponde al instante en que las células se dividen con mayor rapidez.

2.3.4.2. MAPcinasas y su relación con hormonas vegetales

Una de las formas más eficientes que tienen las plantas para responder a estímulos externos, es la producción de hormonas, la cual depende de una serie de acciones en cascada para primero producirlas y posteriormente enviarlas a la región de la planta donde son requeridas o incluso ser elaboradas en dichas regiones. Algunos de estos mecanismos están controlados por la cascada de señalización de las MAPcinasas.

Una de las hormonas vegetales más importantes producida por las plantas es el ácido absísico (ABA), que controla la maduración y germinación de la semilla, la apertura de estomas y la inducción de algunas respuestas ante el estrés abiótico. Esto último se ha ligado

fuertemente a la acción de las MAPcinasas, ya que se ha observado su activación en presencia de una mayor producción de ABA (Grill y Himmelbach, 1998).

Por otro lado, el etileno en plantas funge como la hormona responsable de la maduración del fruto, la senescencia de hojas y flores y participa en la determinación del sexo en plantas. Se ha observado que al inducir un exceso en la producción de etileno en plantas de tabaco, aumentan las cascadas de fosforilación, por lo cual se ha descrito un modelo en el cual el etileno funge como activador de una cascada de MAP cinasas. Un modelo similar está planteado para las auxinas, otra hormona vegetal relacionada con la dominancia apical, el tropismo y la diferenciación en tejidos vegetales (Meskiene y Hirt, 2000).

2.3.4.3. Respuesta a estrés abiótico

A lo largo de la vida de una planta, ésta se ve sometida a diversos periodos de estrés abiótico, incluyendo altas o bajas temperaturas, sequías e inundaciones y estrés osmótico, producidos por cambios ambientales del ecosistema en el cual se desarrollan. Varias de las respuestas a estrés se han ligado al incremento de transcritos específicos y a la activación de MAPcinasas.

Cuando *A. thaliana* es sometida a estrés mecánico y deshidratación, se observa un incremento en los transcritos de de la AtMKK1 y 2 (ambas pertenecientes al tipo de las MAP2K). Aunque no ha sido totalmente dilucidado el proceso, ésto sugiere una relación directa entre una cascada de MAP cinasas y la respuesta a estas condiciones (Jonak *et al.*, 1999). De igual manera, en condiciones de hiperosmolaridad se observa la activación de MAPcinasas en presencia de concentraciones de 100 a 500 mM de NaCl.

En la respuesta al estrés por frío en *Arabidopsis* se registra la activación de AtMPK19, MEKK1 y la AtMPK3, integrantes de las MAPK, MAPKK y MAPKKK, respectivamente, que integran la cascada completa de señalización encargada de responder a este estrés (Jouannic *et al.*, 1999).

2.3.4.4. Respuesta ante patógenos

Las plantas responden a infecciones potenciales provenientes de otros organismos, reconociendo su presencia y posteriormente activando respuestas que impiden o menguan el ataque al que se ven sometidas; para ello deben protegerse creando diversos mecanismos de defensa; las cascadas de MAP cinasas son parte de estos mecanismos.

El ácido salicílico es segregado como una respuesta al ataque de patógenos, su activación

esta ligada con la SIPK (una MAPK), lo cual sugiere la interacción de estos dos mecanismos de respuesta. De igual manera, las infiltraciones de elicitores extraídos de *Phytophthora infestans* y *Phytophthora parasitica* en tabaco, inducen la activación de una MAPCinasa de 47kDa (Sususki y Shinshi, 1995) y la activación de una cinasa de 40 kDa (Zhang *et al.*, 1998), respectivamente.

2.4. La interacción planta-patógeno

En las plantas, la enfermedad puede definirse como la interrupción del conjunto de procesos fisiológicos que le son naturales (nutrición, crecimiento o reproducción) a causa de la invasión de un huésped que provoca una suspensión, alteración o inhibición de estos eventos. Esta interacción es natural y puede ser entendida de la siguiente manera: así como las plantas dependen de los recursos provenientes del medio ambiente para su crecimiento y desarrollo, de igual manera existen organismos dependientes de los recursos sintetizados por las plantas para su supervivencia. Los parásitos son un grupo biológicamente importante dentro de este conjunto, su supervivencia está basada en la infección de la planta en la búsqueda de las sustancias indispensables para completar exitosamente su ciclo de vida. Esta interacción resulta en un beneficio para el patógeno, pero provee de serias desventajas a la planta, ya que ésta, al ser infectada, puede ser dañada en cuanto a su estructura y fisiología, que la puede conducir a un estado de enfermedad o incluso de muerte.

A lo largo de la historia evolutiva que involucra la interacción planta-patógeno, los organismos vegetales han implementado reacciones de defensa contra sus atacantes, capaces de menguar o evitar el embate de virus, bacterias y hongos (entre los considerados de mayor patogenicidad). La evolución de estos mecanismos de defensa ha llevado a la planta a adquirir especificidad en contra de sus patógenos, ésto se traduce en sistemas moleculares, encargados de reconocer la invasión de un patógeno y de generar respuestas de defensa capaces de proteger a la planta.

El estudio de estos mecanismos de respuesta es de suma importancia para comprender el papel de la evolución en las interacciones planta-patógeno, así como para interpretar esta relación a nivel bioquímico y molecular, es por ello que es importante detallar el sistema encargado del reconocimiento y la reacción de defensa de una planta ante un patógeno.

2.4.1. El ataque de los patógenos

La estructura de las plantas está diseñada para resistir variaciones ambientales y el contacto

agresivo con otros organismos. En sus hojas, tallos y raíces hay células especializadas que impiden la entrada de agentes extraños que pudiesen afectar a la planta. Para que haya una infección, el patógeno primero debe introducirse a la planta, por lo que los organismos que infecten a la planta debieron crear mecanismos para introducirse a ella y lograr su propósito. Entre estas estrategias podemos identificar a 1) la irrupción mecánica, 2) las armas químicas, divididas a su vez en i) enzimas y ii) toxinas (Agrios, 1997).

Se contemplan dos tipos de irrupción mecánica: la agresiva y la no violenta, esta última consiste en la entrada del patógeno por los poros naturales de la planta, tales accesos los constituyen los estomas, las lenticelas, los hidátodos, algunos tricomas y heridas no provocadas por el patógeno. La irrupción mecánica agresiva consiste en la ejecución de una herida por parte del patógeno, tal es el caso de los hongos, quienes dañan la pared celular con ayuda de las hifas hasta lograr introducirse a la célula; de igual manera esta estrategia es típica de nemátodos, quienes ayudados por estructuras bucales devoran las paredes celulares y así tienen acceso al interior de la célula.

Las armas químicas son secretadas por los patógenos con el propósito de eliminar de forma química los impedimentos físicos que le impiden adentrarse a la célula. Algunos patógenos segregan enzimas específicas, con el propósito de desintegrar algunas de las moléculas que le confieren resistencia física a la planta. Estas enzimas especializadas pueden ser las cutinasas, las hemicelulasas, las celulasas y las ligninasas, que degradan, cutina, celulosa, hemicelulosa y lignina, respectivamente; de esta manera al eliminar las barreras físicas, el patógeno entra con facilidad.

Las toxinas son proteínas, péptidos, carbohidratos o lipopolisacáridos producidos por un organismo con el propósito concreto de causarle daño al huésped. En el caso de las plantas y sus patógenos, este daño es causado por un disturbio en el sistema celular que causa alteraciones en la fisiología vegetal, hecho que es aprovechado para el ataque del patógeno. Cabe mencionar que el ataque basado en armas químicas conlleva un mayor grado de especificidad entre la planta y su hospedero (Agrios, 1997).

Existen muchas variedades de infección en plantas, éstas dependen directamente del organismo responsable de atacar a la planta y dado que los mecanismos de acción derivan de ello, es importante conocer cuáles son los organismos y sus estrategias más frecuentes para ejercer un ataque eficaz a los organismos vegetales.

2.4.1.1. Virus

Los virus son de los parásitos más especializados que atacan a las plantas, pues dependen totalmente de ellas para poder completar su ciclo de vida, originando en algunos casos, una especialización notable, ya que al limitarse únicamente a atacar ciertas especies, adquieren características específicas que les permiten habitar a sus hospederos.

Los vectores por los que los virus son transportados a sus hospederos incluyen desde el viento, hasta la inoculación directa llevada a cabo por insectos. Una vez que el virus se encuentra dentro de la planta, entra a la célula por receptores específicos de membrana que le permiten la entrada al interior de la célula, en donde replicará su material genético auxiliado por el sistema de replicación molecular del hospedero y creará copias de sí mismo que poblarán el interior de la célula para posteriormente ir al exterior, destruyéndola. Realizado este paso, la infección tendrá lugar en las células vecinas o a distancia, ya que los virus pueden viajar a través del floema e infectar tejidos que se encuentren alejados de su centro de origen (Carrington *et al.*, 1996).

El efecto de su infección se refleja en el necrosamiento de partes localizadas del tejido de la planta y a veces en la muerte de ésta. Algunos de los virus vegetales más estudiados, principalmente por su impacto en la agricultura, son el virus del tabaco y el virus del tomate (Taliensky y Robinson, 1997).

2.4.1.2. Bacterias

En muchos casos, los organismos procariontes son tan pequeños que no necesitan irrumpir de manera agresiva en la planta para tener acceso a ella y la infección se lleva a cabo por estomas y otras entradas naturales hacia el simplasto. Su paso al interior de la célula está mediado por la secreción de enzimas responsables de degradar las paredes celulares que son el impedimento físico para que se lleve a cabo la infección intracelular.

Una vez que la bacteria ha ingresado a la célula, comienza a alimentarse de los compuestos celulares y a su vez comienza a replicarse, extendiendo la infección por todo el tejido vegetal. Este hecho interfiere de manera agresiva con las funciones fisiológicas que lleva normalmente la planta.

En sistemas naturales y agrícolas, la infección bacteriana es bastante común, ya que hay una gran variedad de vectores para llegar al hospedero y además existe un gran número de bacterias especializadas en la infección de organismos vegetales. Esta clase de infección causa grandes pérdidas en producción por el grado de patogenicidad con el que cuentan los hospederos habituales de plantas como son los géneros bacterianos de *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y

Xanthomonas (Agrios, 1997). Los indicios más comunes que evidencian la presencia de estos patógenos son el necrosamiento localizado y la podredumbre de raíces y hojas (Alfano y Collmer, 1996).

2.4.1.3. Hongos

La variedad de especies que existe dentro de este grupo de patógenos implica una gran diversidad de los mecanismos de infección, así como de las respuestas de defensa en las plantas. Los grupos incluidos van desde los microscópicos *Plasmodiophoromycetes* hasta los macroscópicos *Deuteromycetes*, pasando por los *Chitridiomycetes*, *Ascomycetes* y *Basidiomycetes* (Webster, 1980).

La irrupción de los hongos al tejido vegetal incluye métodos como la intromisión del micelio por hendiduras naturales y otros muy sofisticados, como los que involucran la secreción de cocteles de enzimas líticas responsables de eliminar las barreras físicas que le impiden al hongo tener acceso al protoplasma de los tejidos vegetales (Knogge *et al.*, 1996).

Una vez que el hongo se encuentra dentro, libera una gran variedad de toxinas –dependiente del hongo que infecte– generando graves alteraciones fisiológicas en la planta y que son aprovechadas por el hongo para obtener nutrientes. A su vez, el micelio se extiende a través del simplasto para intentar infectar la mayor parte del tejido posible y así tener un mayor éxito con respecto a su ciclo de vida.

A partir del estudio entre la interacción de los hongos y las plantas se han realizado importantes hallazgos acerca de los procesos por los cuales las plantas responden al estrés por patógenos, principalmente con respecto a las toxinas que fungen como evocadores, es decir, aquellos productos tóxicos del patógeno que son capaces de inducir respuestas estructurales y/o bioquímicas de resistencia en la planta ante el organismos que las ataca (Jackson y Taylor, 1996).

Hasta aquí, se ha descrito cómo los patógenos atacan a las plantas mediante diversas estrategias coordinadas que dependen del grupo taxonómico al que pertenece el hospedero, pero es igualmente importante conocer como los organismos vegetales responden al ataque de patógenos mediante sistemas de resistencia mecánicos y químicos, que están mediados por diferentes rutas de señalización molecular.

2.4.2. Formas de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos

En presencia de un agente infeccioso, las plantas no se comportan como hospederos pasivos, ya que poseen un conjunto de sistemas de defensa que se despliegan al momento del ataque, éstos están divididos en pasivos y activos. Los primeros constituyen las barreras estructurales

intrínsecas de la mayoría de las plantas, tales como la cutícula, la pared celular y un reservorio de compuestos antipatógenos, presintetizados y listos para ejercer funciones de defensa. Los mecanismos activos incluyen a las respuestas de defensa que son generadas a causa de la necesaria activación de vías metabólicas específicas creadas por el hospedero a debido al contacto directo con los patógenos –respuesta primaria- y la activación de señales inducidas por elicitores –respuesta secundaria–. Estos eventos conducen a la respuesta de hipersensibilidad denominada HR, que es la muerte celular localizada inducida por patógenos y observada macroscópicamente como manchones localizados de necrosamiento en los tejidos de la planta; este proceso requiere del metabolismo activo de la planta, así como de la activación de la maquinaria transcripcional, para la producción de moléculas capaces de generar respuestas inducidas por las células muertas y que producen señales como especies reactivas de oxígeno, alteraciones en los flujos de calcio, producción de fitoalexinas y reforzamiento de la pared celular. Aparentemente, algunas de estas señales viajan a través del sistema vegetal y son las responsables de activar la resistencia sistémica adquirida (SAR). La SAR se expresa con el propósito de menguar el ataque del patógeno por medio de respuestas hormonales -que en este caso ya no son localizadas, sino generales en toda la planta-, tales como la producción de ABA y etileno (Hutchenson, 1998).

El conocimiento de estos sistemas permite proponer modelos que diluciden los mecanismos moleculares de las respuestas de defensa, así como la ordenación temporal de los eventos que conducen a la activación de la muerte celular y a la resistencia sistémica adquirida.

2.4.2.1. Genes R

Algunas de las respuestas más precisas de defensa están gobernadas desde el genoma, ya que en muchos casos, éste es el responsable de mediar las respuestas de defensa contra los enemigos naturales de las plantas. Los genes designados para ejercer una respuesta ante patógenos en plantas se conocen como genes R; algunos de los productos son proteínas transmembranales con regiones ricas en leucina en la región que da al exterior de la célula (Boyes *et al.*, 1998).

El análisis de el genoma completo de *Arabidopsis* ha permitido la detección de 150 secuencias homólogas de probables genes R, que se encuentran distribuidos en los primeros cinco cromosomas. El número uno contienen 49 secuencias, el cromosoma 2, dos secuencias, 16 secuencias se hallan en el 3, 28 en el cromosoma 4 y el cromosoma 5 contiene 55 secuencias (Mayer, 1999). El estudio evolutivo de los genes R arroja la posibilidad de que esta familia

multigénica se haya creado por una serie de duplicaciones dentro del genoma, evento que permitió a la planta contar con una respuesta específica para muchos patógenos.

La especificidad de la interacción planta-patógeno se ve ejemplificada con la respuesta llamada gen por gen. Ésta consiste en la detección de un elicitor producido por el patógeno y codificado por un gen conocido como *avr* (avirulencia) mismo que es reconocido por el producto del gen R, lo cual desembocará en una activación de las vías de transducción de señales y culminando en la activación de la respuesta de defensa de la planta (McDowell y Dangl, 2000).

2.4.2.2. Metabolitos secundarios

Las plantas elaboran un vasto arsenal de productos naturales, muchos de ellos son consecuencia de la evolución de la respuesta de defensa enfocada a ciertos tipos de patógenos. Estas sustancias son producto del metabolismo secundario de la planta, derivados generalmente de las vías sintéticas de los isopropanoides, fenilpropanoides alcaloides y ácidos grasos - secretados según la familia a la que pertenezca la planta- (Dixon, 2001). Su función es menguar el ataque del patógeno, como quedó demostrado en una prueba realizada en alfalfa, en la que se silenció el gen de la estilbeno-sintasa responsable de defender al tejido vegetal en presencia del hongo *Phoma medicaginis*. En las plantas silenciadas, el hongo logró la infección de más del 40% de la hoja, mientras que en las plantas en el que el gen de la estilbeno-sintasa era funcional, el hongo logró infectar apenas un 8% de la hoja (Dixon, 2001).

Los productos de defensa provenientes del metabolismo secundario son sintetizados con base en cascadas de señalización, que comienzan con la recepción de la señal de ataque y que en muchos casos desemboca en una transcripción masiva de genes, y que en consecuencia originan proteínas que son las encargadas de elaborar los productos de defensa o que funcionan ellas mismas como tales (Dixon, 2001).

Cabe mencionar que la respuesta integrada por genes y metabolitos secundarios es muchas veces considerado un análogo de la inmunidad en animales, ya que a lo largo de la evolución, la especificidad que se ha adquirido en la defensa es tan eficiente, que evita en su totalidad una posible infección a la planta, es decir, le confiere inmunidad.

2.4.2.3. Muerte celular programada (PCD)

La HR representa una forma de muerte celular programada llevada a cabo con el fin de

suprimir el crecimiento del patógeno, ya que si no existe un sustrato en el que éste pueda prosperar, queda confinado junto con la eliminación de las células de la planta y de esta forma la infección no se disemina hacia otros tejidos vegetales.

El mecanismo de acción que desemboca en PCD como respuesta ante el ataque de un patógeno aún no está dilucidado en su totalidad, pero en experimentos recientes se ha observado que la adición de transcritos de proteínas que unen GTP, del tipo de las Ras (involucradas en la respuesta de defensa) resulta en un efector positivo en la muerte celular asociada a HR ante la respuesta de invasores fúngicos de frijol (Kawasaki *et al.*, 1999).

3. ANTECEDENTES INMEDIATOS

En la literatura se ha informado de aumentos en la expresión del gen de la SPT (Birch *et al.*, 1999) debida a la infección con *Phytophthora infestans* en papa. Así mismo, se ha descrito la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), fitoalexinas y la activación de muerte celular programada (Stone *et al.*, 2000) debida a la exposición con FB1 en *A. thaliana*. También existen informes acerca de la inducción de la PCD como resultado de alteraciones en el metabolismo de esfingolípidos provocado por la exposición a la toxina AAL (homóloga estructural de la FB1) (Spassieva *et al.*, 2002). Finalmente, se ha propuesto que los esfingolípidos tienen actividad elicitora en plantas, ya que inducen la acumulación de fitoalexinas produciendo mayor resistencia a infecciones subsecuentes (Koga *et al.*, 1998). Estos resultados han sugerido que algunas especies de esfingolípidos o sus predecesores participan en la respuesta de defensa a patógenos.

Utilizando a la toxina fúngica FB₁ –proveniente del Ascomiceto *Fusarium verticillioides*- como herramienta para modificar los niveles endógenos de esfingolípidos, nuestro equipo de trabajo ha generado información acerca de la relación entre las respuestas de defensa que posee y/o genera una planta ante el ataque de un patógeno y la alteración en el metabolismo de esfingolípidos. Específicamente, se ha observado un aumento de bases de cadena larga esfinganina (SN) y fitoesfingosina (PS) en células de embriones de *Zea mays*, en una proporción con respecto al control de:

- a) 10.5 veces de SN (membrana plasmática) (Gutiérrez *et al.*, 2001).
- b) 6.1 veces de SN (homogeneizados totales) (Rivas, 2001).
- c) 4.4 veces de PS (microsomas) (Gutiérrez *et al.*, 2001).
- d) 3.6 veces PS (homogeneizados totales) (Rivas, 2001).

También se ha demostrado que la exposición a FB1 ó esfinganina (SN) en ejes embrionarios de *Zea mays* induce:

- a) Pérdida de la integridad del DNA genómico (Alcántara, 1998).
- b) Activación de nucleasas (De la Torre, 2005).
- c) Trascricpción de genes asociados con respuestas de defensa (San Juan, 2001).
- d) Elevación de los niveles endógenos de ácido salicílico (Rivas, 2004).
- e) Aumento en la expresión del gen HGRP (Greaves, 2005).

La exposición de embriones de *Zea mays* a *Fusarium verticillioides* induce:

a) Aumento en los niveles de esfinganina (Sánchez, 2006).

Por otro lado la exposición a FB₁ en hojas de *Phaseolus vulgaris* induce:

a) Resistencia a *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* (Palacios, 2007).

Y la exposición de frijol a *Pseudomonas syringae* induce:

a) Incrementos transitorios en los niveles de PS (Palacios, 2007).

Otra posible respuesta de defensa en plantas reportada en nuestro laboratorio, es la activación de MAPcinasas dependientes de la adición de esfinganina, o bien, debida a la incorporación de FB₁ al tejido de *Zea mays* (Saucedo, 2004), observándose:

a) La activación de una MAPK de 45 kDa que parece ser un ortólogo de la MAPK6, una MAPK activada en respuesta a patógenos. La activación se da intermitentemente en un intervalo de tiempo de los 12 min a las 24 h.

Hay reportes recientes en la literatura de MAPcinasa activadas por esfingolípidos en animales (Mathieson y Nixon, 2006), lo que abre la posibilidad de que en sistemas vegetales exista un evento homólogo, y que la cascada de señalización MAPcinasa esté muy ligada a los efectos observados en esfingolípidos después de la adición de FB₁ y en especial de las BCL, como se observa en los antecedentes recabados en nuestro grupo de trabajo.

Cabe mencionar que la investigación de estos eventos moleculares, contribuirá al conocimiento sobre el papel que juegan las cascadas de señalización de las MAPcinasas y las BCL, como vías suplementarias al repertorio de respuestas que generan las plantas frente al ataque de un patógeno; indagación situada en un terreno poco explorado, pero promisoriamente fértil.

4. HIPÓTESIS.

La cinética de acumulación de esfingolípidos sintetizados *de novo*, se corresponde con los tiempos de activación de MAPK.

5. OBJETIVO.

Evaluar la síntesis *de novo* de BCL en presencia de FB₁, a los tiempos en los que se presenta una activación de MAPK en embriones de *Zea mays*.

5.1. Objetivos particulares.

- 1.- Adecuar el proceso de imbibición y homogeneización de los tejidos a las condiciones requeridas para la detección en los cambios de niveles de esfingolípidos y sus precursores marcados con serina radioactiva.
- 2.- Poner a punto las metodologías para la infiltración de serina radioactiva en hojas de *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*.
- 3.- Determinar las condiciones óptimas para la extracción de esfingolípidos y sus precursores en los tejidos expuestos.
- 4.- Detectar el efecto de la FB₁ sobre los intermediarios de la vía de síntesis de esfingolípidos.
- 5.- Identificar los compuestos detectados.
- 6.- Evaluar el cambio en los niveles de esfingolípidos en los tiempos de activación de las MAPcinasas.
- 7.- Correlacionar la cinética de acumulación de esfingolípidos con la activación de MAPcinasas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

- Embriones de *Zea mays* variedad Chalqueño, cosecha 2004.
- Hojas de *Phaseolus vulgaris*.
- Hojas de *Arabidopsis thaliana*.

6.2. Imbibición de embriones con L-[³H (G)] serina y Fumonisina B₁

6.2.1. Imbibición de embriones de *Zea mays*

Los embriones se desinfectaron con cinco lavados de 2 min cada uno, los primeros dos se realizaron con hipoclorito de sodio al 5 % diluido 1: 10 y los restantes con agua estéril para posteriormente ser colocados en cajas de 3.5 cm de diámetro con 3 mL de agar (agarosa 0.6% y 2% de sacarosa).

Para su germinación, fueron incubados a 29 °C en oscuridad durante 19 h, posteriormente se transfirieron a una nueva caja de Petri (mismas características que la anterior), en la que se adicionaron 400 μCi de L-[³H (G)] serina. El tiempo de incubación se prolongó hasta cumplidas las 23 h, momento en el cual se realizó una segunda transferencia a cajas de petri de 5 cm de diámetro con 5 mL de medio (agarosa 0.6 %, 2 % de sacarosa) y 20 μM de FB₁. Transcurrido un tiempo “x” de exposición a FB₁, los embriones fueron congelados en N₂ liq. y almacenados a -70 °C.

6.2.2. Infiltración en hojas de *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*

Con el objetivo de poner a punto la metodología para determinar los niveles de intermediarios en la síntesis *de novo* de esfingolípidos en hojas de *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*, se administró serina tritiada a los tejidos vegetales por los métodos de infiltración y escarificación.

La infiltración consistió en hacer penetrar la solución acuosa de L[³H (G)] serina bajo la presión de una jeringa en el envés de la hoja de la planta en seis puntos distribuidos lateralmente a lo largo de la vena media. Se infiltraron 100 μCi de la señal radioactiva repartidos equitativamente en dos hojas dejando transcurrir 2 h 30 min después de la adición de la serina radioactiva.

La escarificación se logró frotando el envés de la hoja con un cilindro de vidrio esmerilado hasta retirar la epidermis. Se distribuyeron uniformemente 100 μCi por hoja, plateando sobre el área escarificada y dejando transcurrir 2 h 30 min después de la adición de la serina radioactiva.

6.3. Determinación del incremento en peso húmedo y el crecimiento radicular.

El peso húmedo fue medido a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.5, 10, 23, 25, 27 y 30 h de imbibición y la protrusión radicular fue medida a las 19, 24, 27, 30, 41, 43, 44, 47 y 52 h de germinación.

Las condiciones evaluadas se esquematizan en la Figura 3 e incluyen el número y posición de los embriones, así como concentraciones y volúmenes de agarosa al 0.6 y 1%.



Figura. 3. Condiciones evaluadas durante la germinación en embriones de *Zea mays*. Cada círculo representa la condición en la cual germinaron los embriones; se incluye el número de embriones y la posición en el medio de germinación en la que fueron embebidos (debajo o sobre la agarosa). A la derecha de la figura se muestra la concentración de agarosa utilizados en cada ensayo.

Estas condiciones se probaron en cajas de 1.5 cm de diámetro con 1.5 mL de agarosa, así como en cajas de 3.5 cm de diámetro con 3 mL de agarosa, y comparadas con una caja de 5 cm de diámetro con 6 embriones germinados sobre 5 mL de agarosa al 1% que se utilizó como control, ya que ésta era la condición original usada en el laboratorio en experimentos previos. Se realizaron tres repeticiones por ensayo.

6.4. Homogeneización del tejido vegetal

El tejido vegetal fue pulverizado en un mortero con ayuda de N₂ liq. para posteriormente adicionarle amortiguador de homogeneización (ver Apéndice II), en un volumen igual al peso final del tejido ocupado. Se procede a homogeneizar esta mezcla durante 2 min con el homogeneizador (Tissue Tearable modelo 985-370).

Realizado el homogeneizado, éste se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C con la finalidad de recuperar el sobrenadante (que correspondió a la fracción microsomal) para ser resguardado a -70 °C.

6.5. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Se realizó un curva patrón en base a la lectura de diferentes cantidades de BSA (1µg/1µL) en espectrofotómetro a 595 nm, como se indica en la Tabla 1 de los tubos 3 al 6. La concentración de proteína en la muestra fue determinada realizando dos ensayos con 4 µL de homogeneizado

(tubos 9 y 10). Como blancos fueron utilizados los tubos 1, 2, 7 y 8.

Tabla 1. Elaboración de un ensayo de cuantificación de proteína por el método de Bradford. En la tabla se indican los reactivos y la concentración en la que estos fueron añadidos en cada tubo para ser leídos en el espectrofotómetro a 595nm.

Tubo	Agua (mL)	BSA (μ L)	Reactivo BIO-RAD (μ L)	Amortiguador (μ L)	Homogeneizado (μ L)
1	1	-	-	-	
2	0.8	-	200	-	
3	0.79	1	200	-	
4	0.76	4	200	-	
5	0.72	8	200	-	
6	0.68	32	200	-	
7	0.76	-	200	4	-
8	0.76	-	200	4	-
9	0.76	-	200	-	4
10	0.76	-	200	-	4

6.6. Extracción lipídica

6.6.1. Técnica de Folch (Folch *et al.*, 1957)

En un tubo de vidrio con capacidad de 10 mL, se aforaron con 500 μ L de solución salina, 2 mg de proteína membranal resuspendida en amortiguador de homogeneización. A esta mezcla se le adicionaron 100 μ mol de estándar interno, que consistió en una BCL o una ceramida, según lo que se tuvo interés en extraer y cuantificar.

Se añadió 1 mL de metanol-butil hidroxitolueno (metanol-BHT) y se agitó en vórtex durante un min, posteriormente se añadieron 2 mL de cloroformo-BHT para agitar en vórtex durante un min. Al término de la adición de los solventes, se centrifugó 5 min a 3500 rpm con el fin de recuperar la fracción inferior del centrifugado, la cual fue sometida a dos re-extracciones con cloroformo-BHT y sus centrifugados respectivos, ambos se realizan en las mismas condiciones que la extracción inicial.

En caso de que la fracción de cloroformo resultante quedase turbia, se añadió metanol-BHT hasta aclarar el tubo, esto con el fin de romper la emulsión (0.5 mL a la vez), posteriormente se adicionó Na_2SO_4 al 100% agitando en vórtex hasta eliminar el H_2O contenida en la mezcla. Con el fin de eliminar los residuos de Na_2SO_4 en la mezcla, ésta se filtró a través de una pipeta Pasteur que contenía algodón. Finalmente, este filtrado se evaporó con una corriente de N_2 gas hasta su sequedad total. El extracto fue resguardado a -4°C .

6.6.2. Técnica de hidrólisis básica (Markham, 2006)

En un tubo Pyrex de 10 mL se agregó 1 mL de Ba(OH)₂ al 10%, adicionar 5 mg de fracción microsomal junto con 100 μmol de estándar interno; a esta solución se le adicionó 1 mL de dioxano para finalmente ser agitado en vórtex durante 1 min. Posteriormente se deja reposar en parrilla durante 16 h a 110°C. Al término de este lapso se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a la adición de 2 mL de (NH₄)₂SO₄ 2% y de 2 mL de dietil éter; posterior a la agregación de estos compuestos, se agitó en vórtex durante 1 min para centrifugar por 10 min a 3000 rpm a 4 °C. Terminado este lapso, se recuperó la fracción superior y se procedió a evaporar con N₂ gas hasta que la muestra quedara completamente libre de humedad.

6.6.3. Técnica para BCL provenientes del tejido total (Markham *et al.*, 2006)

El tejido vegetal fue pulverizado en mortero con ayuda de N₂ liq. para que al finalizar se obtuvo el peso total del tejido en polvo y se tomaron 0.2 g de (conservar el restante a -70°C) para ser transferidos a un tubo de homogenizador DUALL preenfriado. Se agregaron 1600 nmol de estándar interno junto con 2 mL de la fase inferior del solvente “H” (propanol: hexano: agua, 55: 20: 25; v/v/v) y finalmente, se homogeneizó hasta disgregar totalmente las partículas.

Una vez realizada la homogeneización, la muestra fue transferida a un tubo Pyrex preenfriado para ser incubada a 60 °C por 15 min en parrilla. Se agitó en vórtex ocasionalmente (lo necesario). Posteriormente, sin dejar que el tubo se enfriara, se centrifugó a 1500 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo Pyrex preenfriado para recuperar el pellet y transferirlo al homogenizador DUALL con el fin de realizar dos re-extracciones más, hasta obtener tres sobrenadantes; los cuales fueron mezclados en un sólo tubo para obtener así el extracto final. Finalmente, éste se dividió en cuatro partes iguales y se evaporó con N₂ gas hasta lograr que la muestra quedara libre de humedad. La resuspensión se realizó en 500 μL de de metanol.

6.7. Separación e identificación por TLC de intermediarios de la síntesis *de novo* de esfingolípidos marcados y no marcados con L-[³H (G)] serina

El corrimiento de las muestras se hizo en placas de sílica tipo F₂₅₄ con lámina de aluminio y poro de 60 Å. La fase móvil seleccionada fue 80: 18: 2, CHCl₃: CH₃OH: CaCl₂ 0.22%, con 1h de saturación en cámara.

La aplicación de las muestras se realizó con 0.5 cm de espacio entre sí y con 3 cm de espacio entre el bloque de las muestras tritadas y los estándares de esfingolípidos de interés que se

colocaron en la placa en una concentración de 10 nmol. Al término de las aplicaciones, la placa fue introducida en la cámara hasta que el frente alcanzó 1 cm debajo del borde superior de la placa. Después, la placa fue separada en dos partes que se sometieron a dos técnicas diferentes de revelado; estas secciones correspondieron a la de los estándares (revelado con Cu o ninhidrina) y la porción de las muestras tritiadas (autoradiografía).

6.7.1. Técnica de revelado con Cu

La placa cromatográfica ya eluída, fue secada de 1 a 3 min para ser colocada dentro de la campana de extracción en un recipiente de vidrio con la solución reveladora de cobre (ver composición en el Apéndice II); esta se humedeció totalmente para posteriormente retirarla de la solución y eliminar el exceso del revelador. La placa fue introducida por 15 min en un horno a una temperatura de 150–180 °C. Finalizado este periodo, se sacó del horno para que alcance la temperatura ambiente.

6.7.2. Técnica de revelado con ninhidrina

Una vez que la placa cromatográfica terminó su periodo de elución, se dejó secar de 1 a 3 min para ser colocada dentro de la campana de extracción en un recipiente de vidrio con la solución reveladora de ninhidrina (ver composición en el Apéndice II), para después retirarla de la solución y eliminar el exceso del revelador. Se introdujo en un horno con temperatura de 150 – 180 °C por 15 min para posteriormente enfriarse a temperatura ambiente. Se consideró oportuno reproducir la placa en un archivo digital una vez revelada, ya que las bandas teñidas ytienden a desvanecerse con el tiempo.

6.7.3. Revelado de la placa cromatográfica por autoradiografía

En un cuarto oscuro, prensar dentro de un cassette de revelado la placa cromatográfica junto un film de autorradiografía X-Omaet, sensibles al azul, marca Kodak. Posteriormente, el cassette fue resguardado a -70 °C por el tiempo necesario para que la marca radioactiva se impregnase en el film. Una vez transcurrida la exposición, se permite que los cassettes alcancen la temperatura ambiente para extraer el film del cassette en el cuarto oscuro. El film se sumerge en solución reveladora GBX al 18% hasta la aparición de las bandas. En seguida, se realiza un lavado con agua para después sumergir la película en solución fijadora GBX al 18%. Finalmente se dejó secar la placa revelada.

7. RESULTADOS

7.1. Imbibición de embriones de *Zea mays*

El proceso de imbibición requirió de ajustes en las condiciones necesarias para obtener una adecuada incorporación de L³H (G) serina en los embriones de maíz sin que esto implicara altos costos. La reducción del número de embriones a embeber, la concentración del medio de imbibición, el tamaño de las cajas y el tiempo de imbibición, fueron los parámetros que se modificaron y que debieron evaluarse para cerciorarse de que estas adecuaciones realizadas en las condiciones de germinación, no representarían cambios con respecto a las condiciones de germinación usadas en el ensayo de activación de MAPcinasas, que consistieron en colocar seis embriones sobre el medio en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con 5 mL de agarosa al 1 %, por lo cual dichas condiciones fueron replicadas en esta serie de experimentos como control. La germinación fue evaluada en términos de varios parámetros fisiológicos: viabilidad (% de germinación), cinética de toma de agua (% de incremento de peso húmedo) y crecimiento radicular (longitud de la radícula).

7.1.1. Cinética de toma de agua y crecimiento radicular en diferentes condiciones de germinación

En esta serie de experimentos se determinó el incremento de peso húmedo (IPH) y el crecimiento radicular para evaluar la cinética de toma de agua y el desarrollo de la radícula, respectivamente, durante las primeras 29 h en diferentes condiciones de germinación. Obtenidos los resultados, se estimaron las medias del IPH y del crecimiento radicular a los diferentes tiempos de germinación con los que se obtuvieron las cinéticas de toma de agua y crecimiento radicular que se muestran en las Figuras 4 y 5.

El tamaño de la caja en la que se germinaron los embriones influyó en la cinética de toma de agua (Figura 4A), siendo deficiente en cajas de 1.5 cm y más rápida en las cajas de 3.5 y 5 cm de diámetro. No se encontraron diferencias significativas entre la cinética de toma de agua en cajas de 3.5 y 5 cm de diámetro durante las primeras 23 h, observándose una germinación óptima en ambas condiciones. Con respecto a las condiciones de concentración de agarosa (Figura 4B), la toma de agua en embriones embebidos tanto en agarosa al 0.6 % como en agarosa al 1 %, fue más rápida de las 0 a las 5 h aumentando gradualmente hasta las 23 h, después de las cuales

hubo una pequeña diferencia entre estas condiciones. Con respecto al número de embriones por caja (Figura 4C), no existieron diferencias significativas en la cinética de toma de agua al germinar 3 ó 6 embriones en agarosa al 0.6 % en cajas de 3.5 cm. El incremento de peso húmedo fue mayor al embeber los embriones sobre la agarosa, a diferencia de cuando se embebieron debajo de ésta (Figura 4D).

No existieron diferencias significativas en la cinética de toma de agua entre la germinación de embriones sobre agarosa al 0.6 % en cajas de 3.5 cm de diámetro con respecto al control (Figura 5A). El crecimiento radicular medido en la reducción a microescala con estas condiciones tampoco presentó diferencias significativas durante las primeras 30 h de germinación; observándose un decremento en horas posteriores a este tiempo (Figura 5B).

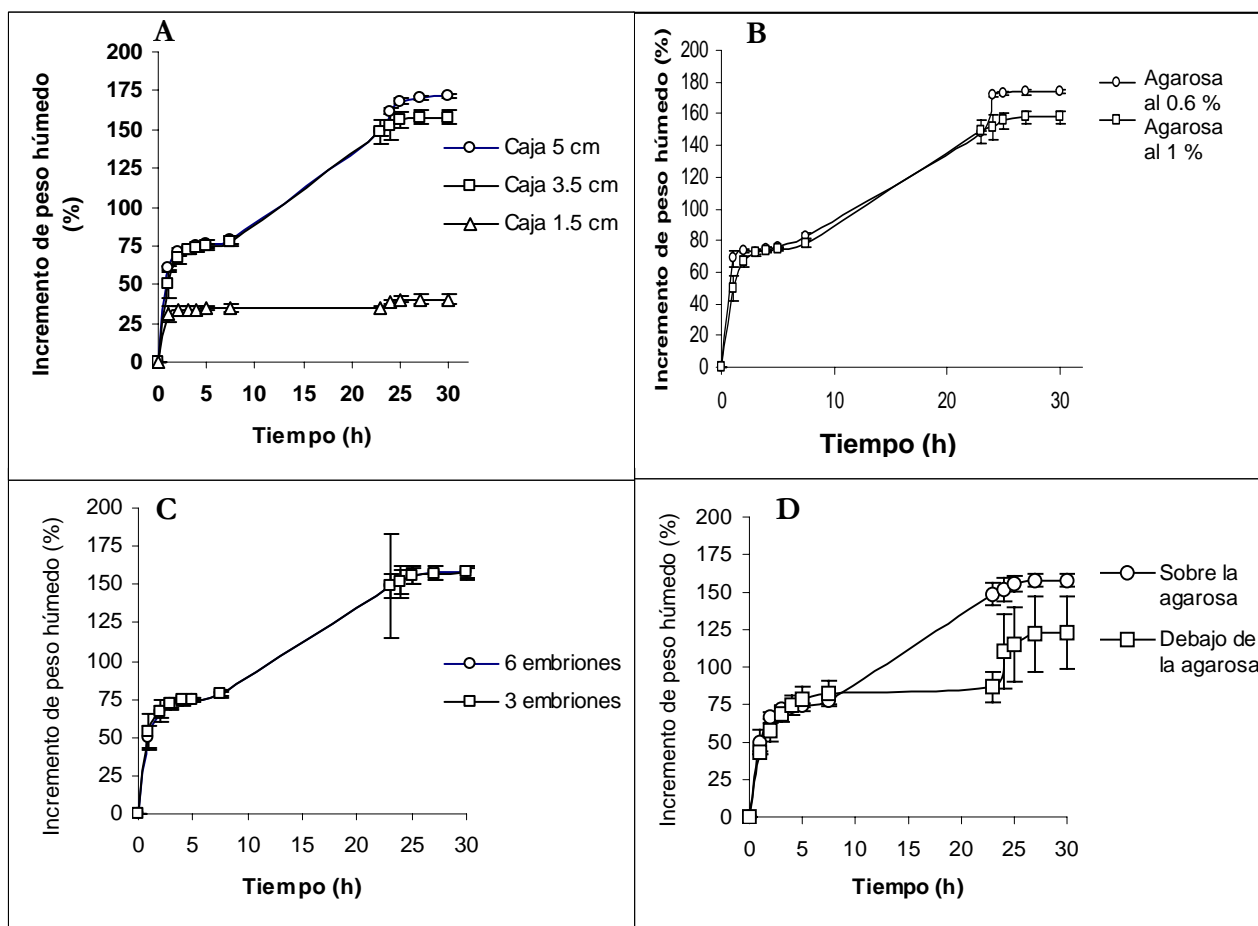


Figura 4. Captación de agua por embriones de *Zea mays* bajo diferentes condiciones de germinación. Se embebieron los embriones en las condiciones señaladas y se pesaron al término de cada una. A) Cinética de toma de agua en cajas de Petri de 1.5, 3.5 y 5 cm de diámetro, germinando seis embriones sobre agarosa al 1%. B) Efecto de la concentración de agarosa en la cinética de toma de agua obtenida de seis embriones germinados sobre diferentes concentraciones de agarosa en cajas de 3.5 cm de diámetro. C) Cinética de toma de agua de seis y tres embriones en cajas de 3.5 cm con agarosa al 0.6 %. D) Cinética de toma de agua al embeber seis embriones sobre ó debajo del agarosa al 0.6 % en cajas de 3.5 cm. Los resultados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

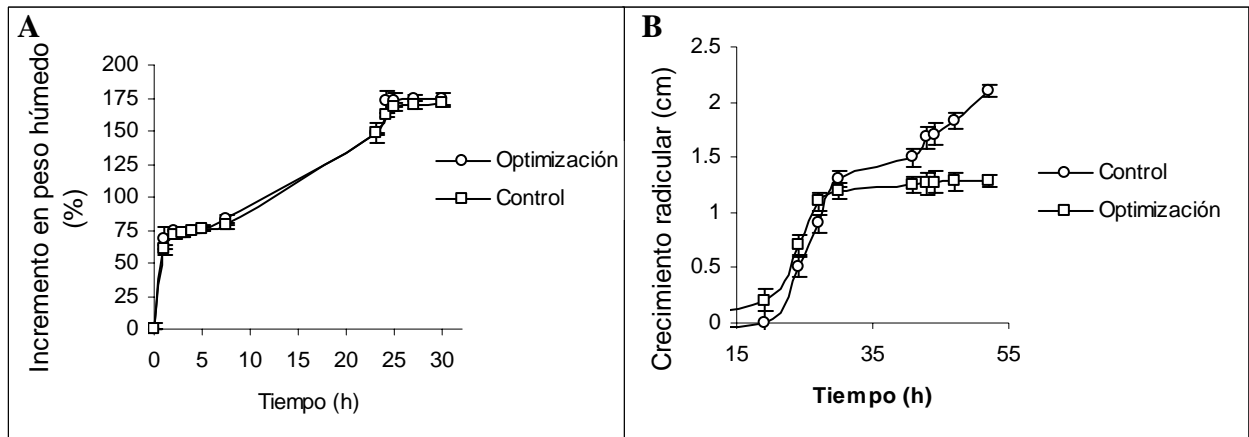


Figura 5. Germinación de embriones en condiciones de optimización y en las del control. A) Comparación de la cinética de toma de agua entre las condiciones control y las seleccionadas para la reducción a microescala (caja de 3.5 cm de diámetro con embriones germinados sobre 3 mL de agar al 1%). B) Efecto de la reducción a microescala en el crecimiento radicular con respecto al control. Los resultados representan la media y su desviación estándar en tres experimentos independientes.

7.1.2. Establecimiento de las condiciones de imbibición de los embriones y de la captación de L-[³H-(G)] serina.

De acuerdo a los resultados obtenidos para las diferentes condiciones de germinación ensayadas en embriones de *Zea mays*, fueron seleccionadas para embeber durante las primeras 23 h:

- a) Cajas de 3.5 cm de diámetro.
- b) 3 mL de agarosa al 0.6 %.
- c) Seis embriones embebidos por caja.
- d) Germinación sobre la agarosa.

De las 23 h en adelante, la germinación se realizó bajo las siguientes condiciones:

- a) Cajas de 5 cm de diámetro.
- b) 5 mL de agarosa al 0.6 %.
- c) Seis embriones embebidos por caja.
- d) Germinación sobre la agarosa.

7.1.3. Obtención de homogeneizados.

Ya que la adecuación de las condiciones para la germinación a microescala repercutió en el número de embriones a partir de los cuales se realizaron los homogeneizados totales, se estudió cómo afectaba ese parámetro en la obtención de homogeneizados provenientes de una cantidad menor de tejido. Para ello se homogeneizaron cuatro cantidades diferentes de embriones,

comenzando por 6.2 g (peso aprox. de los embriones antes de la reducción a microescala y por tanto condición control) y cantidades intermedias de 4, 2.57 y 0.6 g (peso aprox. de los embriones utilizado en las condiciones a microescala) y después se realizó una cuantificación de proteína en los homogenizados por medio del método de Bradford (1976).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II e indican que el porcentaje de recuperación disminuyó entre el control y las tres condiciones de tejido probadas, sin embargo, esta reducción no resultó limitante para el manejo de las muestras y su posterior utilización en las extracciones de lípidos.

Tabla II. Recuperación de proteína obtenida en cuatro homogeneizados realizados con diferentes cantidades de tejido. La tabla muestra los mL obtenidos en la homogeneización, la concentración por mL de proteína obtenida por el método de Bradford (1976), la estimación de la concentración de proteína en el volumen total obtenido del homogenado, el porcentaje de recuperación estimado para cada uno de los ensayos y la desviación estándar obtenida de las tres repeticiones independientes del experimento.

Peso de embriones homogeneizados (g)	Volumen obtenido (mL)	Concentración de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Recuperación (mg de proteína/ g de tejido)	Desviación estándar
6.2	5.2	14.15	73.58	1.186	± 0.17
4.0	2.7	12.63	34.10	0.850	± 0.34
2.5	1.91	11.29	21.56	0.838	± 0.36
0.6	0.53	9.13	4.83	0.806	± 0.39

7.2. Extracción lipídica de tejidos vegetales

Dada la importancia de la extracción lipídica de los homogeneizados, se realizó una búsqueda del sistema más apropiado para la extracción y recuperación de compuestos esfingoideos a partir de tejidos vegetales.

7.2.1. Rendimiento de la extracción lipídica a partir de diferentes cantidades de tejido

Se exploró el efecto de la cantidad de tejido en la recuperación de las especies lipídicas, especialmente después de la adaptación a microescala, ya que la recuperación de algunas bandas (sobre todo las menos abundantes) podría verse disminuida o incluso ser nula. Para ello se realizaron extracciones a partir de 6, 2 y 0.2 g de tejido, en las que se incluyó un estándar interno de esfingomielina con el fin de obtener el rendimiento de la extracción de un esfingolípido de cantidad conocida. El extracto se aplicó en una placa de CCF que se muestra en la Figura 6 junto con el análisis densitométrico realizado a la banda de esfingomielina con el fin de estimar el rendimiento obtenido en la extracción de cada una de las fuentes. Se observó una disminución mínima de la densidad medida en el estándar interno conforme se redujo el peso del tejido. Se pudo apreciar la presencia de por lo menos cinco bandas bien definidas presentes en el extracto lipídico con un Rf. mayor al del estándar interno. Se realizaron tres

repeticiones por tratamiento.

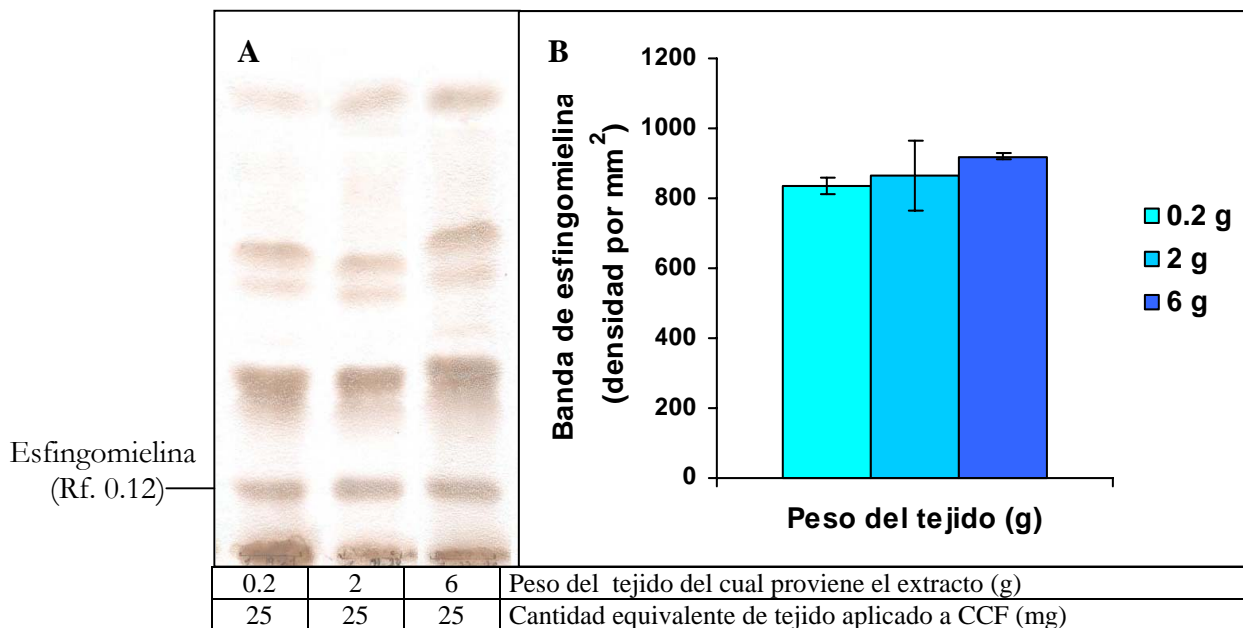


Figura 6. Rendimiento de la extracción lipídica a partir de diferentes cantidades de homogenado. A) Extractos aplicados según el peso del tejido utilizado en la extracción lipídica según Markham *et al.*, (2006) obtenida a partir de embriones de maíz embebidos durante 23 h; los extractos lipídicos fueron aplicados a CCF utilizando la fase móvil $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v). Los tratamientos incluyeron como estándar interno a la esfingomieline, la cual se incorporó en una cantidad de 10 nmol. B) Análisis densitométrico de la banda de esfingomieline incluida en las diferentes condiciones de extracción. Esta gráfica se realizó con las medias y la DS obtenidas en las densitometrías realizadas al estándar interno presente en las muestras de la curva de rendimiento. Se realizaron tres repeticiones independientes por tratamiento, de las cuales se muestra una placa de CCF representativa.

7.2.2. Comparación entre los métodos de Folch, hidrólisis básica y Markham.

Existen diferentes métodos para la extracción lipídica, cada uno recupera preferentemente ciertas clases de lípidos dependiendo de la naturaleza y proporción de los solventes utilizados y de la interacción de éstos con los compuestos lipídicos por extraer; por ello, diferentes técnicas de extracción fueron probadas y comparadas entre sí para seleccionar la que satisficiera en mayor grado las exigencias del presente trabajo.

Las técnicas de extracción lipídica sometidas a estudio fueron Folch (Dolch *et al.*, 1957), Markham *et al.*, (2006) y la extracción de la hidrólisis básica (Morpison *et al.*, 1950). En todos los casos se hicieron extractos a partir de 0.2 g de tejido pulverizado y aongeladm proveniente de embriones embebidos durante 23 h en las condiciones establecidas. A los extractos se le añadió el estándar interno de esfingomieline con el propósito de estimar la recuperación de esfingolípidos después de la extracción. Posteriormente, se corrieron las muestras en TLC, incluyendo un carril con 10 nmol de esfingomieline para ser utilizado como control del rendimiento en las extracciones. La placa de TLC representativa de tres repeticiones así como las medias y la DS obtenidas a partir del análisis densitométrico del estándar interno de tres experimentos independientes se muestran en la Figura 7.

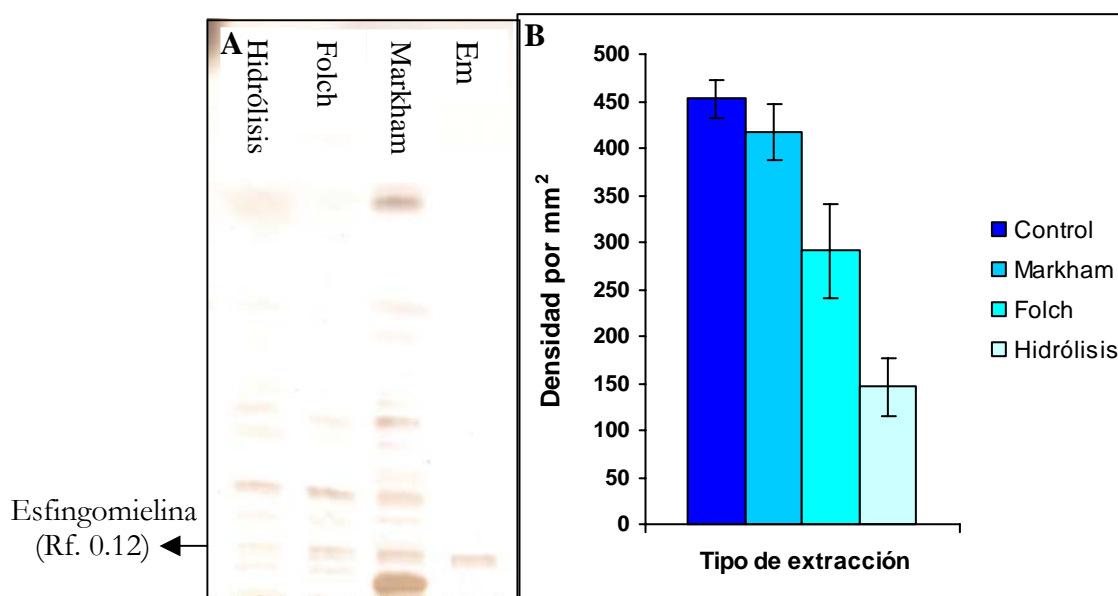


Figura 7. Comparación de tres técnicas de extracción lipídica de embriones germinados durante 23 h. A) Elución en placa de CCF de tres muestras provenientes de diferentes técnicas de extracción a partir de 0.2 g de tejido pulverizado; en cada caso se aplicaron el equivalente a 25 mg de tejido extraído en placas de CCF eluidas en la fase móvil CHCl_3 : CH_3OH : CaCl_2 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v). Los encabezados en cada carril corresponden a la técnica utilizada en la extracción y al estándar de esfingomieline (Em). B) Rendimiento de las técnicas de extracción estimado por densitometría de la extracción del estándar interno. Se grafica la relación entre la densidad estimada en el análisis densitométrico del estándar interno y el tipo de extracción utilizado, el cuál se indica del lado derecho de la gráfica. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. La placa de CCF es una representativa de tres experimentos independientes.

Comparada con las otras dos técnicas de extracción evaluadas, con la técnica según Markham *et al.* (2006) se tuvo una mayor recuperación de especies lipídicas, ya que tanto el número como la intensidad de bandas presentes en la CCF se vio aumentado. Al comparar el estándar interno de esfingomieline que incluían los extractos, también se observó una mejor recuperación con esta técnica.

Con respecto al análisis densitométrico del estándar interno incluido en cada técnica de extracción, los resultados indican que utilizando la técnica de Markham *et al.* (2006) se obtuvo la mayor recuperación.

7.3. Análisis de compuestos esfingoideos por cromatografía en capa fina (CCF)

7.3.1. Curva de aplicación del extracto lipídico a CCF

Debido al procedimiento técnico de Markham (véase la parte de Métodos) no es posible cuantificar proteína en la muestra original, pues se parte del tejido intacto mezclado con los solventes para hacer la extracción, por lo que la cantidad del extracto aplicado en CCF se estimó extrapolando la cantidad de tejido en peso húmedo de la cual se partió; esto representó un problema para la aplicación del extracto en CCF, ya que habitualmente la cantidad de muestra que se aplica, se calcula a partir de la cantidad de proteína cuantificada en el homogeneizado. Por esta razón se realizó una curva de cantidades conocidas aplicadas en CCF

para conocer la cantidad adecuada de extracto a aplicar en términos de mg de tejido extraído.

Partiendo de varios extractos lipídicos obtenido a partir de 200 mg de tejido vegetal en polvo y resuspendido en 200 μ L de Cloroformo-BHT, se aplicaron cantidades equivalentes a 5, 10, 15, 25, 50, 100 y 200 mg de tejido en una placa cromatográfica, como se muestra en la Figura 8.

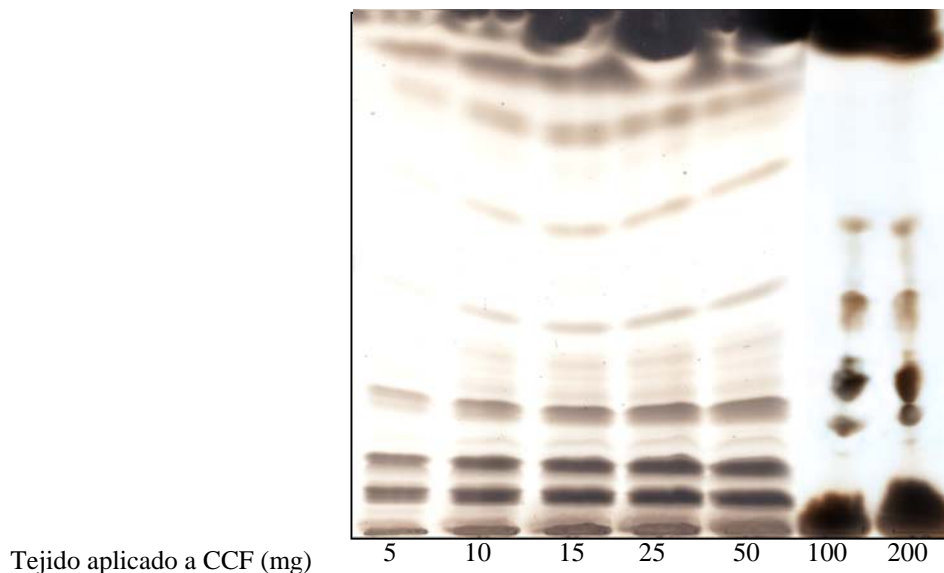


Figura 8. Curva de aplicación de un extracto lipídico obtenido con la técnica de Markham *et al.* (2006) en CCF. El extracto se obtuvo a partir de embriones de maíz embebidos durante 23 h y separado en placas de CCF eludías en la fase móvil CHCl_3 : CH_3OH : CaCl_2 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v). En la parte inferior de cada carril se indica la cantidad aplicada en equivalentes de mg de tejido. La placa que se muestra es la representativa de dos repeticiones de muestras independientes.

Como se puede ver, el equivalente a 5 mg de tejido mostró la ausencia de bandas que sí se observaron en cantidades mayores de extracto aplicado (de 10 a 50 mg). Por otra parte, al aplicar 100 y 200 mg, la separación de las bandas fue deficiente, ya que parte de los compuestos permanecieron en el origen de aplicación y conforme progresó la migración de la muestra, ésta se agregó de forma anómala. Por lo tanto, en estos resultados se observa que la cantidad máxima a aplicar en CCF fue la equivalente a 50 mg de tejido, así mismo se concluye que la cantidad idónea a aplicar es el equivalente a 10 mg, ya que se ocupa una porción mínima de muestra en la que se observa el perfil completo de lípidos contenidos en el extracto.

7.3.2. Adecuación de la fase móvil.

Dependiendo de las características fisicoquímicas de la fase móvil y de la polaridad intrínseca de los lípidos, estos poseen una movilidad específica dentro de la placa de CCF que los hace ocupar un lugar determinado; por lo tanto, dependiendo de los compuestos de interés, la fase móvil debe ser adecuada para permitir su avance y separación con la finalidad de que éstos guarden una distancia adecuada entre sí que facilite su identificación.

Con respecto a la separación de BCL y esfingolípidos complejos, se probaron las fases móviles: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 83:15:2, (v:v:v) y $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v), en las que se corrieron estándares de PS, SN, SO y GC.

La fase seleccionada fue $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v), ya que permitió una buena separación de BCL y esfingolípidos complejos a diferencia de la otra fase móvil evaluada con la que se obtuvo una separación mínima entre los estándares de esfingolípidos aplicados. La comparación entre estas dos fases móviles se muestra en la Figura 9.

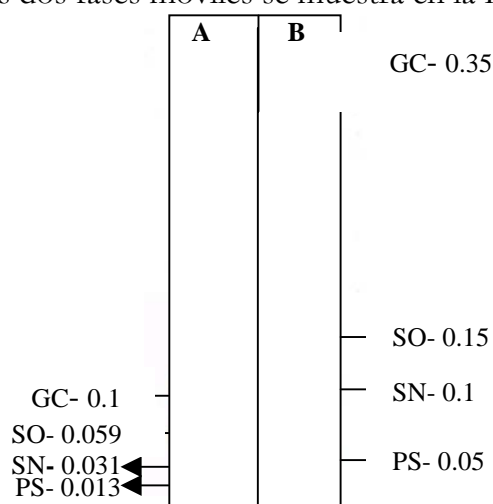


Figura 9. CCF de estándares de esfingolípidos con dos diferentes fases móviles. Se aplicaron diferentes estándares de esfingolípidos en placas de TLC que fueron eluidas en las fases móviles: A) $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 83:15:2, (v:v:v) y B) $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v) provenientes de dos placas distintas y reveladas con sulfato de cobre. Los estándares incluidos de fitoesfingianina (PS), esfingianina (SN), esfingosina (SO) y glucosilceramida (GC) tienen su correspondiente valor de Rf. señalado con una flecha. Las placas cromatografías mostradas son las representativas de dos experimentos independientes. Solo se muestra la sección de la placa cromatográfica en la que se detectó la señal de los lípidos de interés.

También se utilizó como fase móvil una disolución de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCOOH}$, 94:1:5, (v:v:v) para separar ceramidas, la cual permitió una buena separación de los estándares aplicados en una cantidad de 10 nmol por carril que incluyeron a ceramidas de diferente longitud: 16, 18, 20 y 24 carbonos, y dos ácidos grasos insaturados C18:1 y C24:1 como se muestra en la Figura 10. Esta fase se consideró apta para la identificación de ceramidas en CCF.

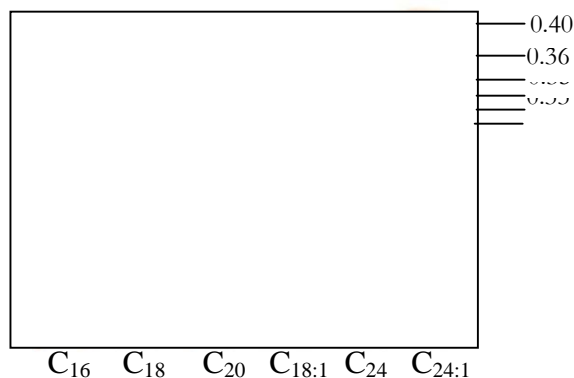


Figura 10. CCF de ceramidas eluida en la fase móvil $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCOOH}$, 94:1:5, (v:v:v) revelada con sulfato de cobre. Los valores localizados sobre cada banda corresponden al valor de Rf. de cada estándar. En la parte inferior de cada carril se indica la especie de ceramida a la que corresponde cada banda. Esta placa es la representativa de dos repeticiones. Solo se muestra la sección de la placa cromatográfica en la que se detectó la señal de los lípidos de interés.

7.3.3. Técnicas de revelado.

Se probaron dos técnicas de revelado, una a base de cobre que permite observar el perfil completo de los compuestos separados en CCF y la ninhidrina, que sólo revela compuestos con un grupo amino libre.

Como lo muestra la comparación de estas dos técnicas de revelado en la Figura 11, el perfil de compuestos observado en los cromatogramas, cuando se utiliza sulfato de cobre, reveló un mayor número de bandas, a diferencia de las dos bandas observadas utilizando la tinción con ninhidrina, debido a la especificidad propia de ambas técnicas de revelado. Por lo tanto, la tinción con ninhidrina se utilizó como apoyo en la identificación de BCL, mientras que la de sulfato de cobre se empleó para revelar el perfil completo de intermediarios presentes en el extracto lipídico.

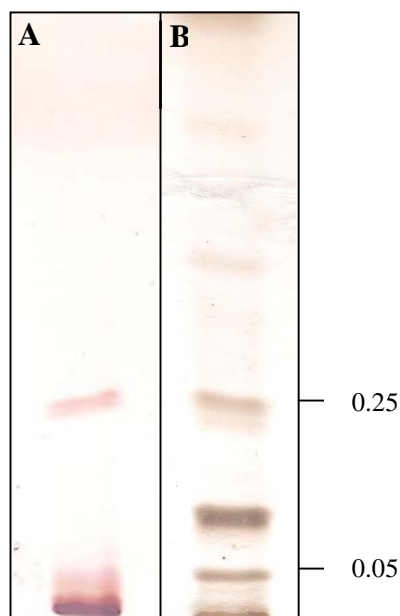


Figura 11. Cromatogramas revelados con sulfato de cobre y con ninhidrina. Se realizó un extracto lipídico según Markham *et al.* (2006) proveniente de embriones de maíz germinados durante 23 h; se aplicó el equivalente a 10 mg de tejido en placas de TLC eluidas en la fase móvil $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v). Terminado este periodo, la placa se recortó para destinar una sección al revelado con ninhidrina (A) y otra al revelado con sulfato de cobre (B). Las placas de TLC mostradas son las representativas de tres experimentos independientes. Solo se muestra la sección de la placa cromatográfica en la que se detectó la señal de los lípidos de interés.

7.4. Perfil de intermediarios de la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos.

7.4.1. Tiempo de exposición a $\text{L}[\text{}^3\text{H}(\text{G})]$ serina de los embriones de maíz.

Para tratar de obtener una incorporación eficiente de la $\text{L}[\text{}^3\text{H}(\text{G})]$ serina en la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos, se tomaron en cuenta factores relacionados con la cinética de toma de agua de los embriones de maíz expuestos al compuesto vía la absorción de agua.

7.4.1.1. Con respecto a la germinación.

La adición de $\text{L}[\text{}^3\text{H}(\text{G})]$ serina debía realizarse en un periodo dentro de las primeras 23 h de

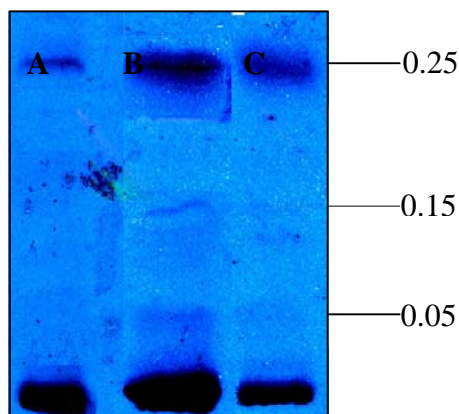
germinación previas a la exposición con FB₁ para poder correlacionar estos datos con otros parámetros estudiados a los mismos tiempos como la actividad de NADPH oxidasa y la activación de MAPKinasas relacionadas con la respuesta a patógenos

La captación de la L^{[3]H} (G)] serina por las células del embrión, se logró por medio de la absorción de agua, por lo cual la cinética de toma de agua se analizó durante las primeras 23 h de imbibición como lo muestran los experimentos de la Figura 5A. Estos resultados mostraron un incremento acelerado en la captación de agua de las 15 a las 25 h, por lo que la exposición de los embriones a L^{[3]H} (G)] serina se llevó a cabo a partir de las 19 h, para aprovechar el incremento en la toma de agua por el embrión en este tiempo y probando tiempos de exposición de 2, 4 y 6 h para que la L^{[3]H} (G)] serina se integrara al metabolismo de esfingolípidos.

7.4.1.2. Con respecto al metabolismo de esfingolípidos.

Para establecer el tiempo óptimo de imbibición, en el que una cantidad adecuada de L^{[3]H} (G)] serina se integre a la ruta de biosíntesis de esfingolípidos y así evaluar el efecto de la FB₁ en los niveles de BCL, se requería que las enzimas de la ruta estuvieran activas para lograr la incorporación. El crecimiento radicular, así como la cinética de toma de agua, son indicadores fisiológicos del metabolismo embrionario. Como se mostró en los resultados de la Figura 5B, se realizó la medición del crecimiento radicular de las 15 hasta las 48 h de germinación, observándose un crecimiento acelerado entre las 15 y las 30 h, lo que sugería que el metabolismo del embrión estaba muy activo durante este periodo.

Para conocer el tiempo de exposición de los embriones a L^{[3]H} (G)] serina, se embebieron con 400 µCi de L^{[3]H} (G)] serina a las 19 h. Cumplidas las 21, 23 y 25 h, dos embriones se retiraron por cada tiempo para realizarles una extracción lipídica. La cantidad de extracto resultante fue limitada, por lo que esta serie de experimentos no cuenta con réplicas dado los altos costos de su repetición. En la placa cromatográfica se aplicó el equivalente a 50 mg de tejido. Una vez eluida la placa con la fase CHCl₃:CH₃OH:CaCl₂ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v), se expuso a la autorradiografía (Figura 12) para estimar, por medio de un análisis densitométrico, la cantidad de radioactividad integrada a la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos. En la placa de TLC se observó una similitud parcial entre el patrón de marcaje radiactivo de bandas en los tres extractos que corresponden a los diferentes tiempo de exposición a la L^{[3]H} (G)] serina, sin embargo el número de bandas y la intensidad de éstas varió en la placa de autorradiografía dependiendo del tiempo al que estuvieron expuestos los embriones a la serina radioactiva.



L ³ H (G) serina (μCi).	400	400	400
Cantidad equivalente en peso de tejido (mg).	50	50	50

Figura 12. Diferentes tiempos de exposición a L³H (G) serina. Los embriones de maíz se embibieron por: A) 2 h, B) 4 h y C) 6 h con serina radioactiva a los que se les practicó una extracción lipídica según Markham *et al.* (2006). El extracto lipídico fue separado en placas de CCF independientes con la fase móvil CHCl₃:CH₃OH:CaCl₂ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v), para ser expuesta en autorradiografías independientes. Las placas que se muestran son resultado de un experimento. Solo se muestra la sección de la autorradiografía en la que se detectó la señal de los lípidos de interés.

Del patrón anterior se seleccionaron dos bandas con Rf. de 0.25 y 0.05 que corresponden a la zona en la que migran las BCL en CCF eluida en la fase móvil antes mencionada para realizarles un estudio densitométrico que se muestra en la Figura 13. A las 2 h de exposición se observó un baja densidad en ambas bandas, indicando una baja integración de L³H (G) serina en los lípidos marcados, A las 4 h la densidad en ambas bandas llegó a su máximo y se mantuvo hasta las 6 h en la banda con de Rf. 0.25, no así en la banda con Rf. de 0.05 que muestra una menor densidad, sugiriendo una disminución de la presencia del aminoácido marcado en este compuesto. Se seleccionó el tiempo de 4 h de exposición a L³H (G) serina.

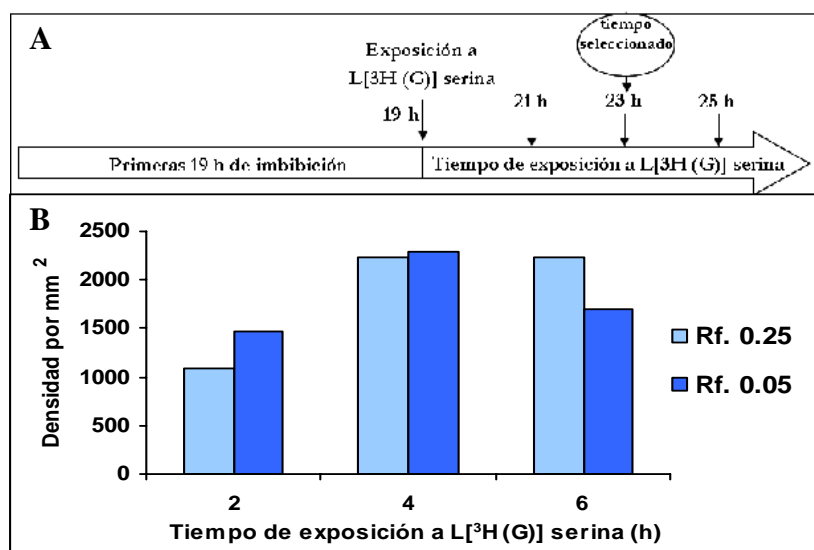


Figura 13. Curva de incorporación de L³H (G) serina a extractos lipídicos de embriones de maíz según el tiempo de exposición. Embriones germinados durante 19 h fueron expuestos a L³H (G) serina durante 2, 4 y 6 h; se les realizó una extracción lipídica, el extracto lipídico fue separado CCF con la fase móvil CHCl₃:CH₃OH:CaCl₂ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v). La placa de CCF resultante fue expuesta a autorradiografía. A) Línea del tiempo que representa los tiempos de exposición a L³H (G) serina, en el cuál se señaladan las 23 h de germinación correspondientes a las 4 h de exposición y que fue seleccionado como el tiempo óptimo de exposición a L³H (G) serina B). Densitometría de las bandas con Rf. 0.25 y 0.02 reveladas en autorradiografía. Estos resultados corresponden a un experimento.

7.4.2. Infiltración de L^{[3}H (G)] serina en *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*

Posteriormente, se realizó la cuantificación isotópica de la L^{[3}H (G)] serina en el extracto lipídico, tomando el equivalente a 5 mg de tejido proveniente de las hojas sometidas a escarificación e infiltración de L^{[3}H (G)] serina. Para ambas condiciones, se realizaron tres repeticiones de la cuantificación isotópica provenientes del mismo extracto lipídico.

Se observó que por medio de la escarificación se pudo integrar una mayor cantidad de L^{[3}H (G)] serina en los tejidos. Sin embargo éste no fue el método elegido para realizar ensayos de incorporación posteriores por ser una técnica muy invasiva. La infiltración resultó ser un método satisfactorio, pues si bien la incorporación fue menor, no produjo un daño extremo, por lo que fue seleccionado para la obtención de intermediarios tritiados. El resultado de estos experimentos se muestra en la Figura 14.

7.4.3. Selección de la concentración de L^{[3}H (G)] serina infiltrada en los tejidos vegetales.

La concentración de L^{[3}H (G)] serina a la que se expuso el tejido para integrarse a la ruta de síntesis *de novo* de esfingolípidos, que permitió la identificación en autorradiografía de las bandas separadas por TLC provenientes de los extractos lipídicos, se determinó como sigue.

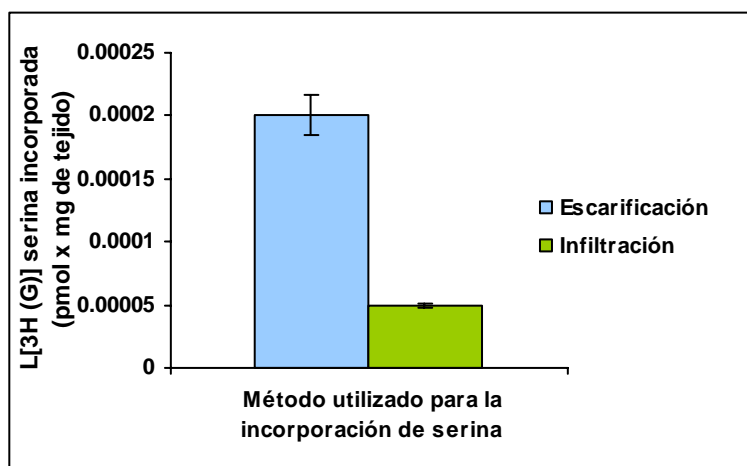


Figura 14. Estimación de la incorporación de L^{[3}H (G)] serina a hojas de frijol por escarificación e infiltración. Una vez aplicado el precursor a las hojas, se realizó una extracción lipídica (Markham et al. 2006) de la que se tomó una muestra equivalente a 1 mg de tejido en el que se realizó un conteo de cpm. Posteriormente se realizó una extrapolación de cpm a pmol de serina por medio del conteo isotópico (0.0001 pmol de L^{[3}H (G)] serina equivale a 1564 cpm). Se presenta la media \pm la DS de tres experimentos independientes.

En el caso de los embriones de *Zea mays* se probaron diferentes concentraciones de L^{[3}H (G)] serina en ensayos independientes y que consistieron en la germinación de seis embriones durante 19 h en las condiciones seleccionadas para su germinación. Cumplido el lapso, los embriones se trasladaron a nuevas cajas de Petri a las que se le adicionaron 40, 100, 200 y 400 μ Ci de L^{[3}H (G)] serina hasta que se cumplieron las 23 h. Concluido el tiempo de exposición

correspondiente, los embriones se congelaron en N₂ liq.

En el caso de *Phaseolus vulgaris* se realizaron ensayos con 100 y 200 μCi de L[³H (G)] serina infiltrados en seis puntos laterales a lo largo de la vena media en dos hojas por cada ensayo. Cumplido un lapso de 4 h de exposición, las hojas fueron cortadas de la planta y se congelaron en N₂ liq..

En *Arabidopsis thaliana* se realizó un ensayo con 160 μCi de L[³H (G)] serina. Se infiltraron 10 hojas en cuatro puntos laterales a lo largo de la vena media como en el caso de frijol. Concluido el tiempo de exposición de 4 h, se cortaron las hojas de la planta y se congelaron en N₂ liq.

Cada ensayo se sometió a una extracción lipídica según Markham *et al.*, (2006). Se aplicó el equivalente a 50 mg de tejido por muestra en placas independientes de CCF que se eluyeron con la fase móvil CHCl₃: CH₃OH: CaCl₂ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v). Al término de la elución, las placas se expusieron a dos películas de autorradiografía. Se reveló una en la primera semana para estimar el tiempo de exposición en el que eran observables las bandas marcadas, según este estimado, se retiró la segunda película para ser revelada. Las placas de autorradiografía correspondientes a estos experimentos se muestran en la Figura 15.

Los ensayos realizados con maíz y frijol, mostraron que al incrementar la concentración de L[³H (G)] serina a la que se expuso el tejido, disminuyó el tiempo de revelado y aumentaron la intensidad y nitidez de las bandas marcadas. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, la única cantidad aplicada de L[³H (G)] serina fue suficiente para detectar algunas bandas.

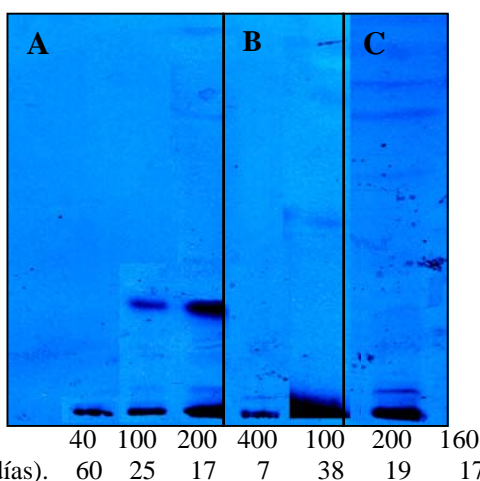


Figura 15. Marcaje radiactivo de extractos lipídicos provenientes de tejidos de tres especies diferentes y expuestos a diferente concentración de L[³H (G)] serina. El tejido vegetal fue expuesto a diferentes concentraciones de serina radioactiva al que posteriormente se le practicó una extracción lipídica según Markham *et al.*, (2006) y que fue aplicada en una cantidad equivalente a 50 mg de tejido en placas de CCF eluidas con la fase móvil CHCl₃:CH₃OH:CaCl₂ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v). Las placas de CCF resultantes fueron expuestas a películas de autorradiografía, las cuales corresponden a extractos lipídicos provenientes de: A) embriones de maíz, B) hojas de frijol y C) hojas de *A. thaliana*. La concentración de L[³H (G)] serina a la que se expuso el tejido se indica en la parte inferior de la figura, así como el tiempo de exposición de la película. Las películas de autorradiografía mostradas son representativas de dos experimentos independientes.

7.4.4. Cuantificación isotópica de L^{[3}H (G)] serina en los extractos lipídicos

Para obtener un estimado de la cantidad de L^{[3}H (G)] serina incorporada a la ruta de biosíntesis *de novo* de esfingolípidos, se realizó una cuantificación isotópica de la serina en extractos lipídicos (mismos con los que se realizaron las autorradiografías en el punto 7.4.3). A partir de los valores obtenidos se estimaron las pmol de L^{[3}H (G)] serina incorporadas en el equivalente a 5 mg de tejido expuesto al aminoácido radioactivo durante 4 h.

Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos se muestran en la Figura 16. Se observa que al aumentar la concentración de L^{[3}H (G)] serina a la que se expusieron los tres tejidos vegetales, aumentaron las pmol determinadas en los extractos lipídicos. Esto fue muy claro en la incorporación de L^{[3}H (G)] serina en maíz, al comparar la cantidad de pmol integradas al tejido cuando se utilizaron 0.04 mCi en comparación con la cantidad de pmol estimado cuando se aumentó la concentración del aminoácido radioactivo a 0.4 mCi.

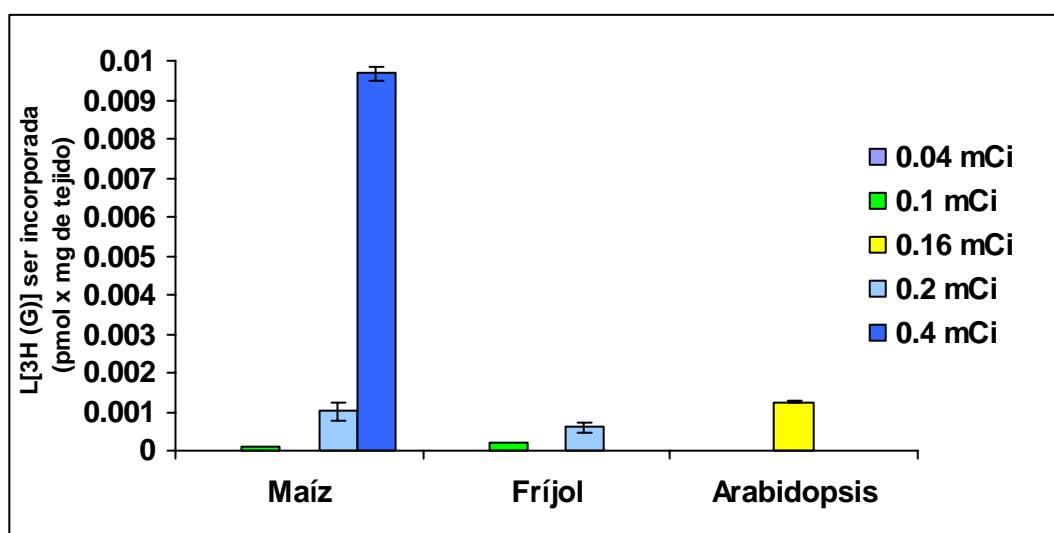


Figura 16. Cuantificación de L^{[3}H (G)] serina en extractos lipídicos provenientes de tejidos vegetales expuestos a diferentes concentraciones del aminoácido. Se realizó un conteo de cpm obtenidas del equivalente a 5 mg de tejido extraído; posteriormente se realizó una extrapolación de cpm a pmol de serina por medio del conteo isotópico (0.001 pmol de L^{[3}H (G)] serina equivale a 15645 cpm) A la derecha de la figura se indican la concentración de L^{[3}H (G)] serina en mCi a la que fueron expuestos los tejidos vegetales. Se presenta la media \pm la DS de los resultados de tres experimentos independientes.

7.5. Identificación de compuestos esfingoideos de embriones de maíz expuestos a L^{[3}H (G)] serina

Ya que el interés de este trabajo era detectar intermediarios de la vía de síntesis de esfingolípidos, el análisis correspondiente se enfocó a la detección de BCL y ceramidas marcadas radiactivamente y separadas por CCF.

7.5.1. Detección de BCL por tinción con ninhidrina.

Para reconocer a las BCL a través de su grupo amino libre en los compuestos detectados por

autorradiografía, se realizó un revelado del cromatograma a base de ninhidrina. La muestra aplicada en CCF y su autorradiografía provinieron de 0.6 g embriones de maíz germinados durante 19 h. Cumplido el tiempo, los embriones se trasladaron a una caja de Petri que contenía 400 μCi de $\text{L}^{[3}\text{H}(\text{G})]$ serina. Se embebieron en estas condiciones hasta cumplidas las 23 h de germinación. Se hizo un extracto lipídico según Markham *et al.* (2006), del cual se aplicó el equivalente a 50 mg de tejido en placas cromatográficas eluidas en la fase móvil CHCl_3 : CH_3OH : CaCl_2 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v). Una de las placas fue teñida con ninhidrina y la otra fue expuesta a autorradiografía. Ambas placas se muestran en la Figura 17, en las que se observa una correspondencia directa de los valores de Rf. correspondientes a las bandas marcadas por ninhidrina y el Rf. de los compuestos que incorporaron $\text{L}^{[3}\text{H}(\text{G})]$ serina que aparecen en la película de autorradiografía. Estos resultados sugieren que ambas bandas mostradas podrían ser BCL.

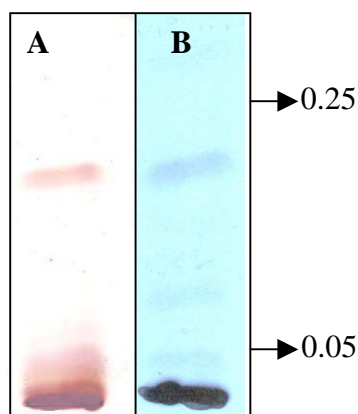


Figura 17. Detección por CCF de lípidos extraídos de embriones de maíz expuestos a serina radioactiva y teñidos con ninhidrina. Se aplicó el equivalente a 50 mg de tejido proveniente de una extracción lipídica de embriones de maíz según Markham *et al.* (2006) en placas cromatográficas eluidas en la fase móvil CHCl_3 : CH_3OH : CaCl_2 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v); al término de la elución, una sección de la placa fue destinada a la tinción con ninhidrina y la otra a la exposición a película de autorradiografía. A) Cromatograma teñido con ninhidrina. B) Autorradiografía proveniente de una sección de la placa cromatografica. Están señaladas una banda con Rf de 0.25 y otra con Rf de 0.02 detectadas tanto en la película de autorradiografía, como en la placa revelada con ninhidrina. Las placas son representativas de dos experimentos independientes. Solo se muestra la sección de la placa cromatográfica en la que se detectó la señal de los lípidos de interés.

7.5.2. Identificación de BCL en ensayos con miriocina

Con el fin de obtener una evidencia adicional a la tinción con ninhidrina sobre la banda con Rf de 0.25, se embebieron 6 embriones en cajas de 3.5 cm de diámetro, con 3 mL de agarosa al 0.6 % con 400 nmol de miriocina por 21 h con la finalidad de inhibir la síntesis *de novo* de esfingolípidos y con ello determinar si se producía la desaparición de las bandas marcadas. Se incluyó un control negativo que no incluía la exposición a miriocina. Finalizadas las 23 h, se trituraron los embriones y se tomaron 0.2 g de tejido, para realizar una extracción lipídica.

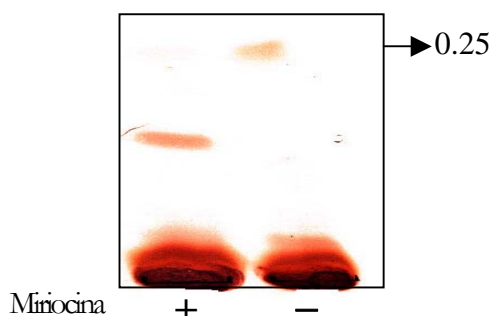


Figura 18. Efecto de la miriocina en la obtención del perfil de bandas teñidas con ninhidrina. Los embriones de maíz fueron embebidos durante 21 h con miriocina junto con su control negativo; se les practicó una extracción lipídica según Markham *et al.* (2006), de la que se tomó el equivalente a 10 mg de tejido para ser aplicado en placas de CCF eluidas en la fase móvil $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v) reveladas con ninhidrina. Se indica el positivo y el negativo del tratamiento con miriocina. La banda con Rf de 0.25 se indica con una flecha. La placa cromatográfica mostrada es representativa de dos repeticiones independientes. Solo se muestra la sección en la que se detectó la señal de los lípidos de interés.

En una placa cromatográfica se aplicó el equivalente a 30 mg de tejido y se eluyó con la fase móvil $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v). Terminado el periodo de elución, la placa se reveló con ninhidrina. Como se muestra en la Figura 18, los embriones de *Zea mays* embebidos 21 h con 400 nM de miriocina sufrieron una reducción de los niveles endógenos de la banda con valor de Rf de 0.25 con respecto a su control.

7.5.3. Identificación de BCL por CLAR

A partir de una placa cromatográfica en la que se separaron los lípidos provenientes de extractos de maíz, se aisló la banda con Rf. de 0.25 para ser resuspendida en 30 μL de metanol puro. Se tomaron 10 μL para derivatizar con naftalen 2, 3-dicarboxialdehído (NDA) para detectar compuestos con un grupo amino libre como el que poseen las BCL y se inyectaron directamente en la columna de HPLC; del mismo modo se inyectaron como control 10 μL de la muestra que no fue expuesta al agente derivatizante.

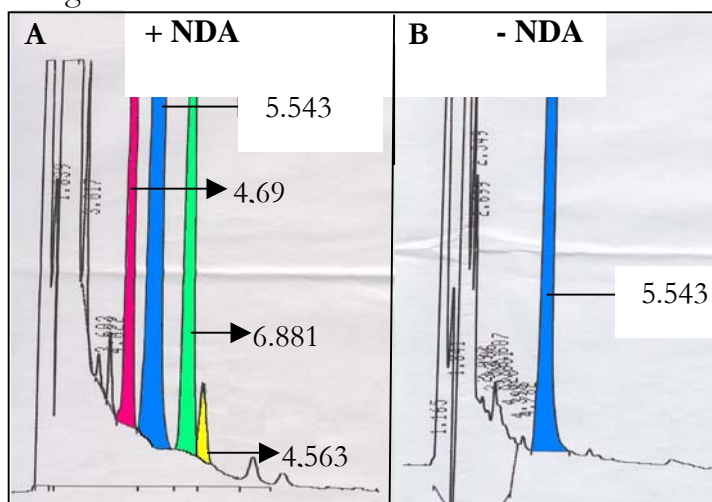


Figura 19. Análisis de la banda con Rf 0.25 por CLAR. A) Cromatograma obtenido realizando la reacción de derivatización con NDA. B) Cromatograma obtenido sin realizar la reacción de derivatización. Las flechas colocadas a un lado de los picos describen el tiempo de retención (en min) de cada compuesto. Cromatogramas representativos de dos experimentos independientes.

En la Figura 19 se observa que la banda con Rf de 0.25 estaba formada por cuatro compuestos al ser analizada por CLAR. Tres de ellos mostraron tiempos de retención de 4.69, 5.543 y 7.563 cuando se analizó la muestra derivatizada con NDA y no fueron detectados al omitir el agente derivatizante. El pico con tiempo de retención 5.543 apareció con y sin la reacción de derivatización.

7.5.4. Identificación de compuestos esfingoideos radiactivos por la exposición de placas cromatográficas a autorradiografía.

Se adecuó una fase móvil que permitiera separar esfingolípidos complejos y BCL ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v)) y otra que sirviera para separar ceramidas ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3:\text{OH}:\text{CHCOOH}$, 94:1:5 (v,v,v)). En ambos casos se separó una muestra de extracto lipídico proveniente de embriones de maíz germinados durante 19 h, más 4 h de imbibición con 400 μCi de $\text{L}^{[3}\text{H}$ (G)] serina. En la misma placa de cromatografía en la que se separó la muestra, se colocaron estándares de esfingolípidos o ceramidas (según la fase móvil en que fue eluída la placa cromatograficas), con la finalidad de identificar por medio del Rf los lípidos detectados por exposición de la placa cromatográficas a película de autorradiografía.

Por medio de este ensayo se logró la detección de dos BCL en la muestra, una de ellas migró con un valor de Rf de 0.05 que se corresponde con el estándar de PS y la otra migró con un valor de Rf de 0.15 que se corresponde con el estándar de SO. Estos resultados se muestran en la Figura 20.

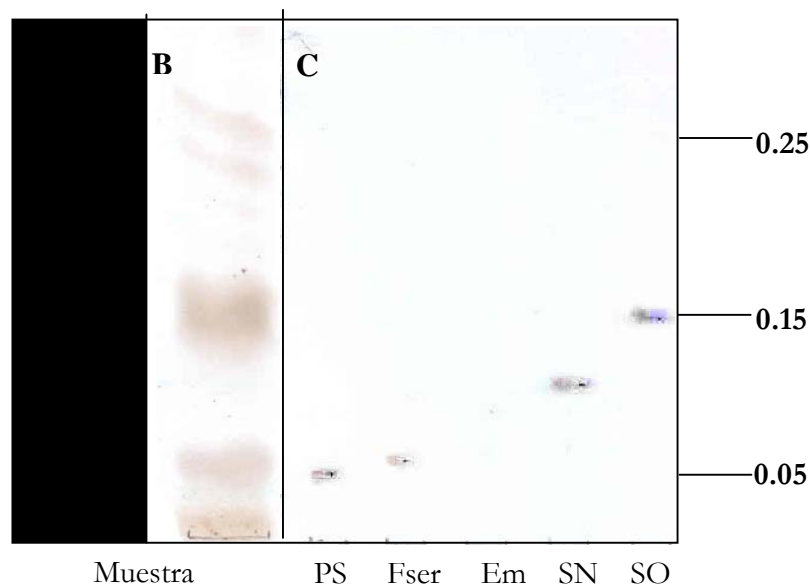


Figura 20. Identificación de BCL marcadas radiactivamente y separadas por TLC. La sección A y B de la figura corresponden respectivamente, a una película de autorradiografía proveniente de la exposición de una placa cromatográfica corrida en la fase móvil [$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v)] , en la que se separó una muestra de extracto lipídico según Markham *et al.*, (2006), realizado con embriones de maíz expuestos a 400 μCi de $\text{L}^{[3}\text{H}$ (G)] serina durante 4 h. C) Sección de estándares eluídos en la misma placa cromatográfica en la que se corrió la muestra. Los valores de Rf. de la PS y la SO están señalados del lado derecho de la figura. La película de autorradiografía y la placa de CCF corresponden a un experimento representativo de dos independientes.

En el mismo extracto se logró la identificación de una ceramida putativa con un valor de Rf. de entre 0.27 y 0.28 correspondientes a los estándares de la C18:1 y la C24, respectivamente, como se observa en la Figura 21, así mismo se logró la identificación de otra banda con Rf. de 0.29 que no coincidió con ningún estándar disponible.

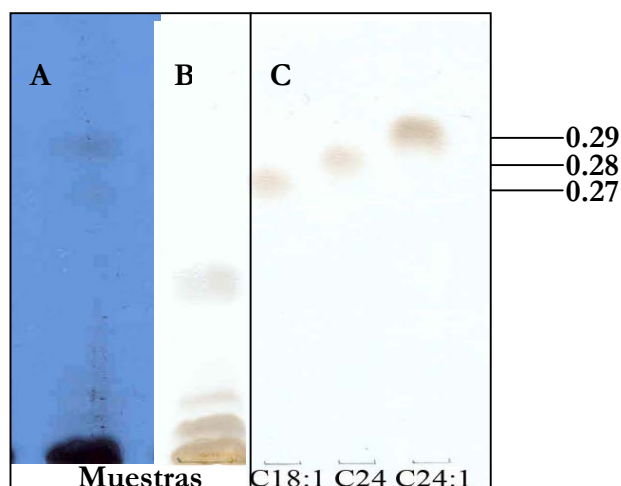


Fig. 21. Identificación de ceramidas por CCF expuesta a autorradiografía. Las secciones A y B de la figura corresponden respectivamente, a una película de autorradiografía proveniente de la exposición de una placa de CCF corrida en la fase móvil [CHCl_3 : CH_3 : OH : CHCOOH , 94:1:5 (v,v,v)], en la que se separó una muestra de extracto lipídico según Markham *et al.*, (2006), de embriones de maíz expuestos a 400 μCi de $\text{L}[\text{}^3\text{H (G)}]$ serina durante 4 h. C) Estándares. La película de autorradiografía y la placa cromatográfica son representativas dos experimentos independientes y únicamente se muestra la porción en la que aparecieron lípidos de interés.

7.6. Efecto de la FB_1 en la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos.

Con el propósito de evaluar la síntesis *de novo* de BCL en presencia de FB_1 , a los tiempos en los que se presenta la activación de MAPquinasas en embriones de *Zea mays*, se determinaron los niveles endógenos de BCL, ceramidas y esfingolípidos complejos sintetizados *de novo*. Para ello se partió de un cultivo de 12 embriones repartidos equitativamente en dos cajas de Petri en las condiciones elegidas para la imbibición. Los embriones de maíz se germinaron durante 19 h en la oscuridad a 29 °C. Al término de este periodo se les transfirió a otra caja que incluía 400 μCi de $\text{L}[\text{}^3\text{H (G)}]$ serina a la que los embriones se expusieron durante un periodo de 4 h adicionales a las 19 h previas de germinación. Cumplido el lapso de 23 h (éste fue considerado como el tiempo cero del experimento con FB_1), los embriones se expusieron a FB_1 junto con un control negativo durante 0.5, 2, 4, 6 y 12 h; posteriormente se realizó la extracción lipídica de cada una de las muestras tratadas para ser separadas e identificadas por CCF; para finalmente exponer a autorradiografía con la finalidad de observar la marca radioactiva presente en los lípidos extraídos provenientes del tratamiento con FB_1 y de su control. La placa cromatográfica así como la autorradiografía representativa que describen la cinética de BCL en el curso de en presencia de FB_1 , se muestra en las Figuras 22 y 23.

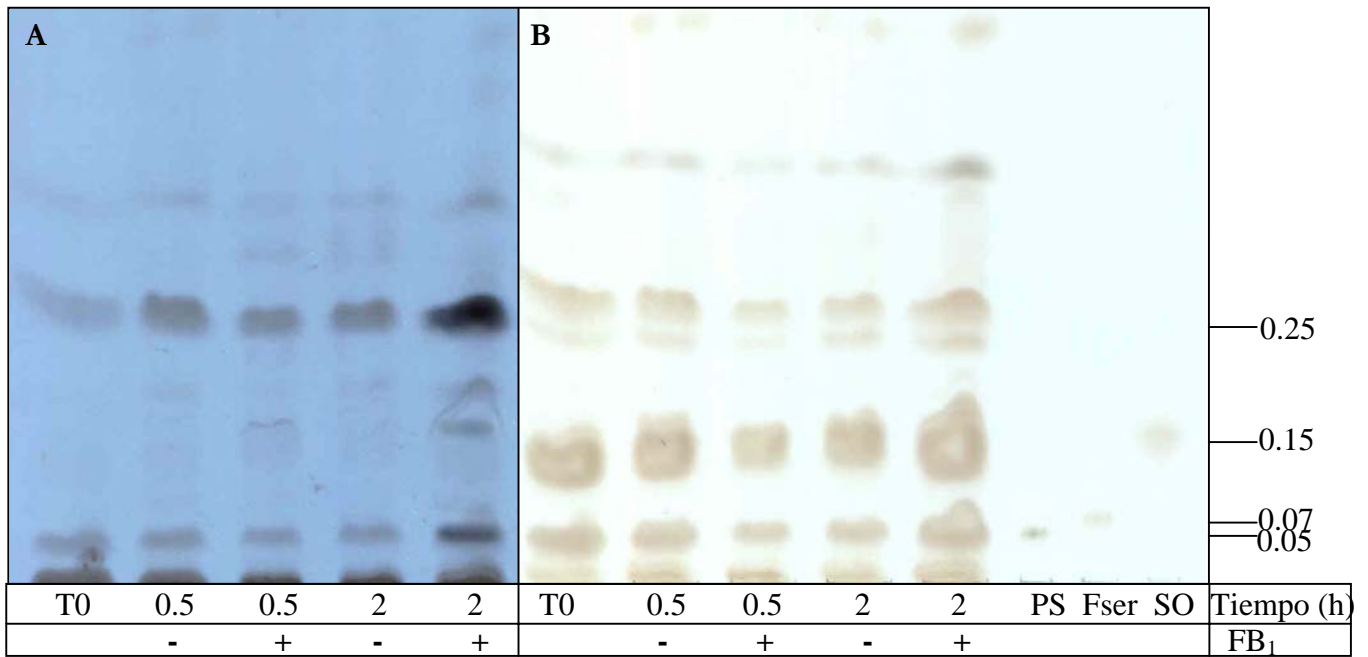


Figura 22. Curso temporal de exposición a FB₁ de embriones de maíz expuestos a L[³H] serina. Extractos lipídicos de maíz obtenidos según Markham *et al.*, (2006), separados en placas cromatográficas eluidas con la fase móvil CHCl₃:CH₃OH:CaCl₂ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v) y expuestas a película de autorradiografía. A) Autorradiografía obtenida a partir de B) una placa cromatográfica en la cual se separaron los extractos lipídicos correspondientes a cada tiempo de exposición y que incluye los estándares de Fitoesfingosina (PS), Fosfatidil serina (Fser) y Esfingosina (SO). Se indican los tiempos de exposición a la toxina y con un signo positivo (+) se denotan las muestras que fueron expuestas a FB₁ y con un signo negativo, (-) los controles de cada tratamiento. Se indica el valor de Rf. de los estándares, así como de una BCL putativa con Rf. de 0.25. La autorradiografía y la placa de CCF mostradas son representativas de tres experimentos independientes. Únicamente se muestra la porción de la placa cromatográfica y la autorradiografía en la que aparecieron lípidos de interés.

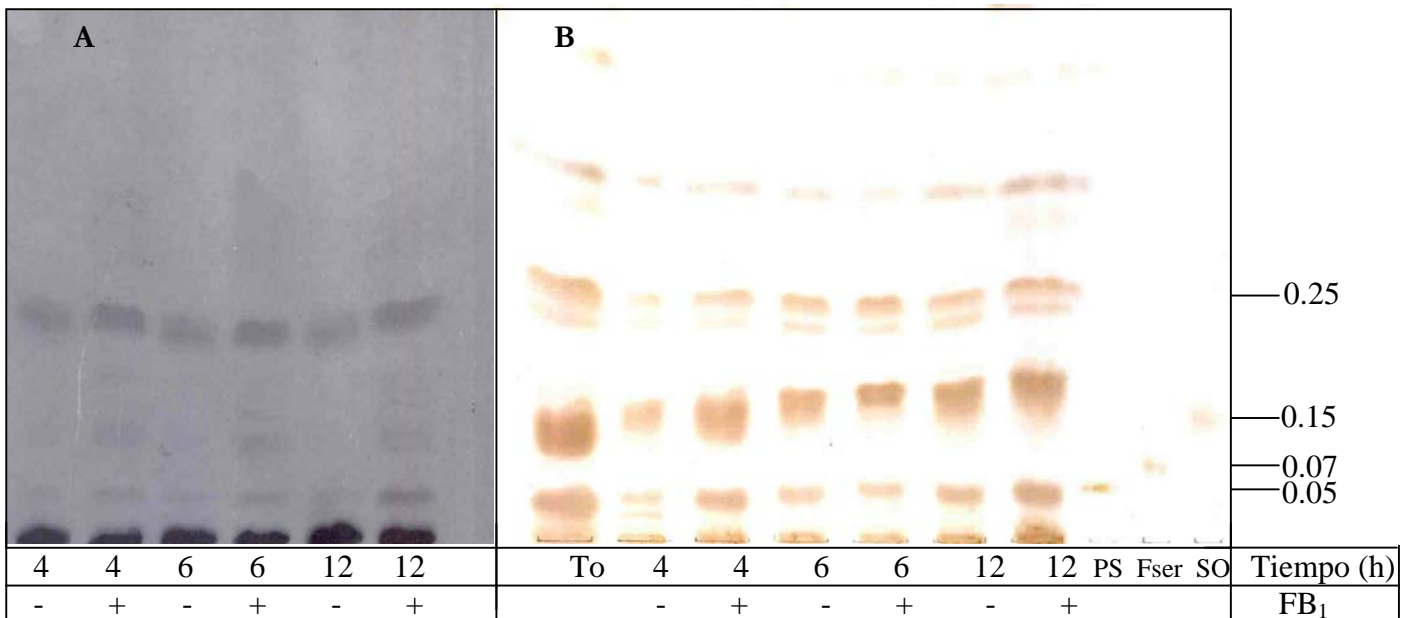


Figura 23. Curva temporal de exposición a FB₁ que incluye el T0 y 4, 6 y 12 h, de embriones de maíz expuestos a L[³H] (G) serina. Extractos lipídicos de maíz obtenidos según Markham *et al.*, (2006) separados por CCF con la fase móvil CHCl₃:CH₃OH:CaCl₂ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v) y expuestas a película de autorradiografía. A) Autorradiografía obtenida a partir de B) una placa cromatográfica en la cual se separaron los extractos lipídicos correspondientes a cada tiempo de exposición y que incluye los estándares de Fitoesfingosina (PS), Fosfatidil serina (Fser) y Esfingosina (SO). Se indican los tiempos de exposición a la toxina FB₁ con un signo de más (+) y con un signo de menos (-) los controles de cada tratamiento. Se indica el valor de Rf. de los estándares, así como de una BCL putativa con Rf. de 0.25. La autorradiografía y la placa cromatográfica mostradas son representativas de tres experimentos independientes y sólo se muestra la porción de la placa cromatográfica y la autorradiografía en la que aparecieron lípidos de interés.

La exposición a 40 μM de FB_1 causó la acumulación consistente con respecto al control, de una BCL con un Rf. de 0.05 que coincide con el de la fitoesfingosina, a las 2 y 4 h en las tres repeticiones realizadas del experimento. Así mismo, en los mismos tiempos se observó un incremento de una BCL con un Rf. de 0.15 que corresponde a la esfingosina y finalmente a las 4, 6 y 12 h se acumuló una BCL putativa con un Rf. de 0.25, que no se logró identificar por medio de estándares comerciales, sin embargo se cuenta con pruebas adicionales (tinción con ninhidrina, ensayos de derivatización, etc.) que sugieren se trata de una BCL.

En lo que corresponde a las ceramidas, se corrieron extractos lipídicos de embriones de maíz que fueron germinados durante 19 h en la oscuridad a 29 °C en las condiciones establecidas para la germinación. Al término de este periodo se transfirieron a otra caja (mismas condiciones que la anterior) que incluía 400 μCi de L^3H (G) serina, en la que los embriones serían expuestos durante un periodo de 4 h adicionales a las 19 h previas de germinación. Cumplido el lapso de las 23 h, los embriones se expusieron a FB_1 junto con un control negativo durante 0.5, 2, 4, 6 y 12 h, las cromatoplasas resultantes así como la autorradiografía de éstas se muestran en las Figuras 24 y 25.

Se observó un decremento de dos ceramidas con respecto al control y que por sus Rf, correspondieron a la C18:1 y C24 (Rf de 0.27 y 0.28 respectivamente) a las 2 y 4 h. Los niveles de una ceramida putativa con Rf. de 0.57 que no se logró identificar por medio de estándares, descendieron también con respecto al control a las 0.5, 2, 4, 6 y 12 h.

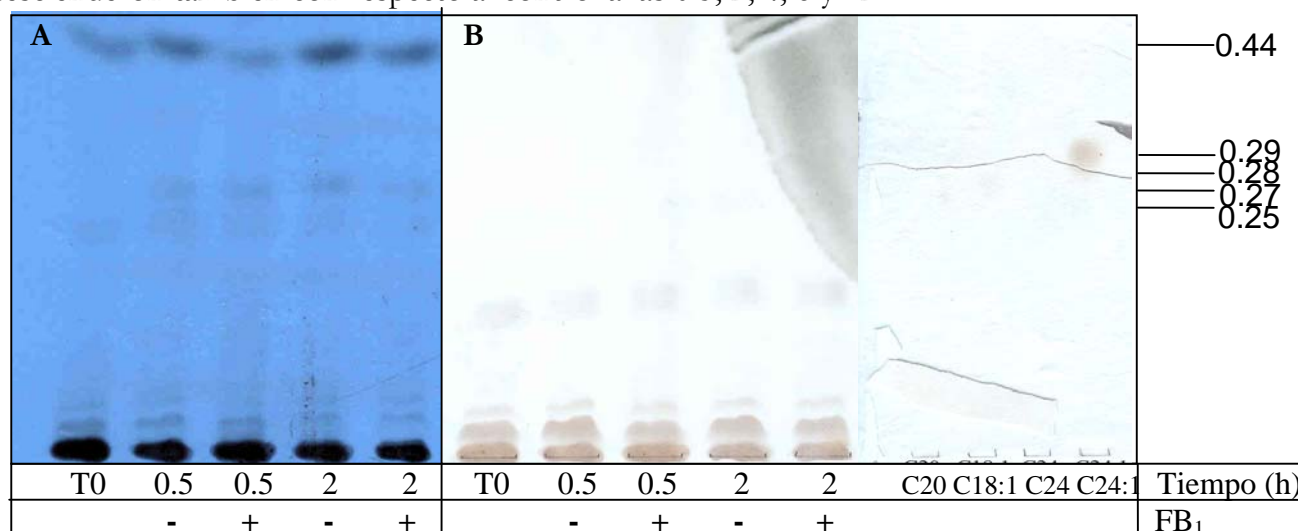


Fig. 24. Curso temporal de exposición a la FB_1 , en embriones de maíz. Detección de ceramidas con la fase móvil CHCl_3 : CH_3OH : CHCOOH [91: 4: 5], (v:v:v). Los tiempos de exposición a la toxina FB_1 , se indican con un signo positivo (+) y con un signo negativo (-) los controles de cada tratamiento. A) Placa cromatográfica revelada con sulfato de cobre en la que se incluyen las muestras y los estándares de C20, C18:1, C24 y C 24:1, para los cuales está especificado su Rf. B) autorradiografía proveniente de la cromatoplasa A. Las flechas indican la altura a la que corren los estándares y especies existentes en la muestra. Así mismo se enfatiza la existencia de una banda problema con Rf de 0.57 que no ha logrado ser identificada. La película de autorradiografía y la placa cromatográfica son representativas dos experimentos independientes y únicamente se muestra la porción en la que aparecieron lípidos de interés.

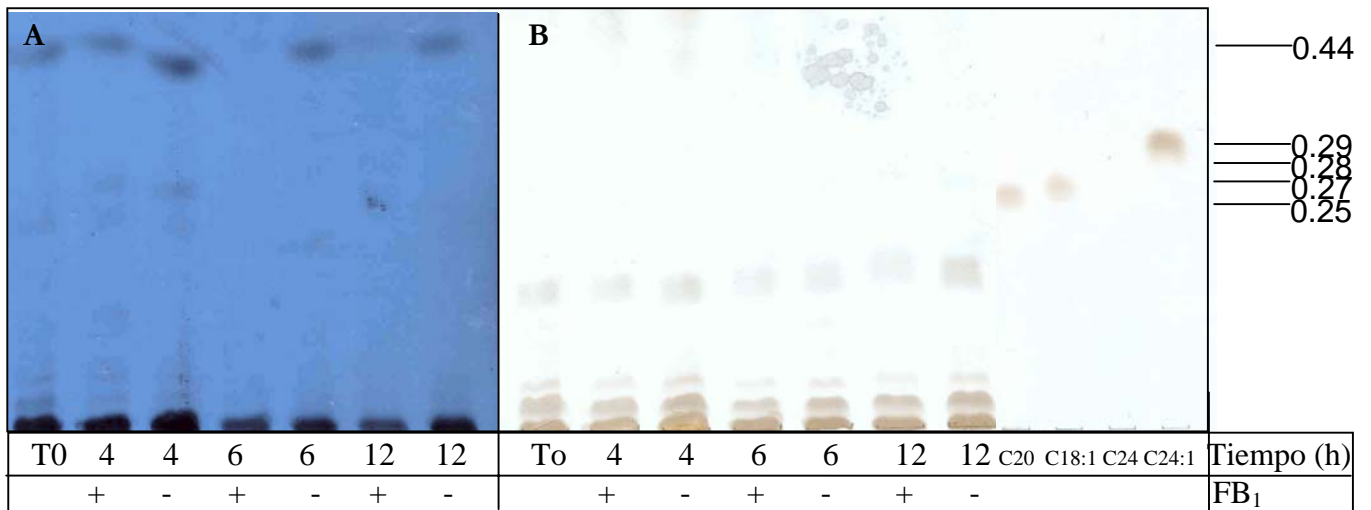


Fig. 25. Curso temporal de exposición de embriones de maíz a la FB₁. Detección de ceramidas en la fase móvil CHCl₃: CH₃OH: CHCOOH [91: 4: 5], (v:v:v). En la parte inferior de cada carril se indican los tiempos de exposición a la toxina, indicando con un signo positivo (+) las muestras que fueron expuestas a FB₁ y con un signo negativo (-) los controles de cada tratamiento. A) Placa de CCF revelada con sulfato de cobre en que incluye la sección de las muestras y los estándares de C20, C18:1, C24 y C 24:1, para los cuales está especificado su Rf. en la orilla derecha de la figura. B) Autorradiografía proveniente de la cromatopla A. Las flechas indican la altura a la que corren los estándares, así como especies existentes en la muestra que migran con el mismo Rf. Así mismo, se enfatiza la existencia de una banda con Rf de 0.57, que no ha logrado ser identificada por medio de estándares. La autorradiografía y la placa de CCF mostradas son representativas de tres experimentos independientes. Únicamente se muestra la porción de la placa cromatográfica y la autorradiografía en la que aparecieron lípidos de interés.

La exposición de los embriones de maíz a 40 μM de FB₁ causó la acumulación de BCL putativas. Esta acumulación se observó a los tiempos en los que se encontró la activación de MAPquinas relacionadas con las respuestas de defensa en plantas. Así mismo, se observó una disminución en ceramidas provocada por la inhibición de la esfinganina-*N*-aciltransferasa vía FB₁.

8. DISCUSIÓN

8.1. Condiciones para el ensayo de marcaje radiactivo de los intermediarios de la síntesis de esfingolípidos en embriones de *Zea mays* en germinación

A fin de minimizar la cantidad de L[³H (G)] serina destinada a la integración de la ruta de síntesis *de novo* de esfingolípidos provenientes de tejidos vegetales, se realizó la adecuación a microescala de las condiciones de germinación, lo que condujo a la posibilidad de que este proceso sufriese alteraciones fisiológicas que impidieran interpretaciones válidas y el establecimiento de correlaciones reales con otros resultados obtenidos en este sistema experimental, como en el caso de la activación de MAPquinas. Por ello, para seleccionar las condiciones a microescala de imbibición de los embriones, se evaluaron como criterios fisiológicos de la germinación la cinética de toma de agua y el crecimiento radicular. Ambos son parámetros clásicos utilizados para conocer el desempeño fisiológico de una semilla tras su imbibición en agua (Besnier, 1990). La captación de agua es el factor más importante en la activación de la germinación, y su disponibilidad a lo largo de ésta mantiene la estabilidad del proceso (Basra, 1995). La manifestación de las tres fases de captación de agua refleja las transformaciones metabólicas que van ocurriendo en la semilla y que son aplicables al embrión de maíz (Sánchez-Nieto *et al.*, 1998). Adicionalmente, un crecimiento radicular constante a partir de la protrusión de la radícula, fundamentalmente por alargamiento de las células de esta región, refleja la disponibilidad de recursos con los que cuenta el medio en el que germina la semilla (agua, espacio ó nutrientes, entre otros), y la capacidad metabólica para desplegar el programa genético de las células de la raíz (Pinedo, 1990). Comparando la cinética de toma de agua y el crecimiento radicular entre las condiciones a microescala y el control, no se encontraron diferencias significativas durante las primeras 23 h de germinación, por lo que la adecuación a microescala que incluyó las modificaciones (reducción del espacio para la germinación, reducción en la concentración de agarosa y aumento en el número de embriones por caja) para la incorporación óptima de la L[³H (G)] serina a las células del embrión, cumplen con las exigencias del presente trabajo.

En el caso del crecimiento radicular se observó un decremento en embriones germinados en cajas de 3.5 cm después de las 30 h. Esto significa que las condiciones de germinación a microescala no presentaban variaciones significativas con respecto al control sólo durante las primeras 30 h, ya que transcurrido este lapso, la reducción de espacio y agua comenzaron a someter a estrés a los embriones decrementando su crecimiento. Por lo anterior, se decidió que

a las 23 h de imbibición, a las cuales se tenía planeada la agregación de FB₁, los embriones serían transferidos a cajas de 5 cm con el fin de no someterlos a estrés al cumplirse las 30 h de germinación.

8.2. Condiciones para la extracción de esfingolípidos y para su separación cromatográfica

Los esfingolípidos de plantas son estructuralmente complejos y especialmente diversos, dada la variedad considerable de ácidos grasos con diferente tamaño de cadena, número y posición de insaturaciones y variaciones en el grupo de cabeza polar unido a las bases de cadena larga, mismo que puede estar integrado por un grupo fosfato, azúcares o a un átomo de hidrógeno como en el caso de la ceramida. Esta heterogeneidad estructural da como resultado una gran gama de propiedades fisicoquímicas entre los compuestos esfingoideos. La elección de un método de extracción lipídica debe considerar estas propiedades debido a que el tipo de esfingolípidos extraídos del tejido vegetal está en función del tipo y proporción de los solventes utilizados en la extracción (Markham *et al.*, 2006, 2007).

Estudios previos en la extracción de esfingolípidos de plantas, han logrado la obtención de una reducida gamma de estos compuestos que han resultado predominantemente neutros, como en el caso de las ceramidas que son relativamente fáciles de purificar en plantas por ser solubles en cloroformo y resistentes a hidrólisis básicas moderadas (Cahoon y Lynch, 1991). La combinación de CH₃OH y CHCl₃ con la que se realiza la extracción lipídica según Folch *et al.* (1957), así como la combinación de C₄H₁₀O y C₄H₈O₂ con la que se extraen lípidos según Morrison *et al.*, (1970), tienden a la extracción preferencial de lípidos neutros como ceramidas y ácidos grasos, lo cual implica que sólo se están purificando porciones substancialmente pequeñas del pool total de esfingolípidos provenientes de tejidos vegetales, ya que estudios muy recientes de extracción de esfingolípidos han demostrado que por ejemplo en hojas de *A.thaliana* hay una gran abundancia de esfingolípidos muy polares e incluso con carga eléctrica negativa, siendo las proporciones: 64 % de hexosa-hexurónico-inositolfosfoceramidas, 34 % de monohexosilceramidas y 2 % de ceramidas (Markham *et al.*, 2006). Estos autores probaron varias condiciones de extracción, encontrando que una extracción con la fase móvil formada de la mezcla de propanol-hexano-agua tiende a extraer una mayor gama de lípidos polares y a su vez lípidos neutros, lo que conlleva a obtener un extracto más representativo de las diferentes especies lipídicas presentes en los tejidos vegetales; además el protocolo que desarrollaron facilita la solubilización de tejido insoluble debido al tratamiento de calor (60°C por 15 min) y

adicionalmente aprovecha la ventaja de que el propanol sea un inhibidor de lipasas (Markham *et al.*, 2006). Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo de tesis se siguió el protocolo mencionado, y así se explica que los extractos lipídicos provenientes de embriones de maíz presentaron un mayor número de compuestos en la separación por CCF cuando se siguió el método de Markham *et al.*, (2006) que los extraídos con el método de Folch *et al.*, (1957) o Morrison *et al.* (1970).

Con respecto a la separación y detección de los intermediarios de la síntesis de esfingolípidos marcados radiactivamente, el sistema implementado en este trabajo, la CCF, permitió detectar diferentes clases de esfingolípidos con una buena resolución y eficiencia. Este mismo procedimiento se ha usado para el análisis del metabolismo de esfingolípidos tanto en sistemas animales (Morrison y Hay, 1970) como vegetales (Kawai *et al.*, 1996). Dentro de este sistema de separación, resulta fundamental la elección de la fase móvil, misma que en nuestro caso se adecuó a los requerimientos del trabajo.

La combinación de los solventes CHCl_3 y CH_3OH mezclados con una fase acuosa de CaCl_2 0.22 % es apropiada para la migración de BCL y esfingolípidos complejos en CCF (Hakomori, 1990), además es selectiva para compuestos esfingoideos por retener en el proceso de elución algunos glicerolípidos, colesterol y sales que no se hallan eliminado en la extracción lipídica (Deckert, 2000), promoviendo una selectividad hacia las bandas de esfingolípidos.

Para conocer la proporción que deben llevar los solventes se recomienda que la porción de CHCl_3 sea mayor que la de CH_3OH , mientras que éste último debe superar la de CaCl_2 0.22% (Deckert, 2000). Para conocer las proporciones específicas con las que se obtendría una buena separación entre los compuestos, se realizaron pruebas con una fase móvil compuesta de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 83:15:2, (v:v:v) y otra de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v), optando por esta última a causa de la adecuada separación obtenida entre bandas con valores de Rf. correspondientes a estándares de BCL y esfingolípidos complejos, en comparación con los resultados obtenidos con la fase móvil $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0.22 %, 83:15:2, (v:v:v).

8.3. Marcaje radiactivo de intermediarios de la ruta de biosíntesis *de novo* de esfingolípidos

Con el propósito de incorporar a la $\text{L}[\text{^3H}(\text{G})]$ serina en la ruta de biosíntesis *de novo* de esfingolípidos y obtener una detección adecuada de los intermediarios tritiados presentes en extractos lipídicos provenientes de tejidos vegetales expuestos a éste aminoácido radiactivo, se

evaluó el método de incorporación, el tiempo de exposición y la concentración adecuada de L^{[3]H} (G)] serina a la que debieron ser expuestas las diferentes especies vegetales con las que se trabajó en este proyecto.

La escarificación y la infiltración fueron los métodos evaluados para la incorporación de serina radiactiva en hojas de *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana* por medio del conteo de la radiactividad (cpm), realizado en los extractos lipídicos. La exposición a 100 µCi de L^{[3]H} (G)] serina por el método de escarificación mostró un aumento considerable en el conteo de cpm con respecto a la cuantificación realizada en el extracto proveniente de hojas infiltradas con serina radioactiva. Sin embargo, pese a que se buscaba optimizar la incorporación de L^{[3]H} (G)] serina a tejidos vegetales, la escarificación fue descartada al causar serios daños mecánicos en la hoja tratada que implican la eliminación de la epidermis. Ésto puede producir una significativa alteración metabólica en las paredes celulares de la hoja, y existen reportes que hacen referencia a la alteración de lípidos membranales a causa del estrés mecánico sufrido por presión sobre las paredes celulares (Akinlaja y Sachs, 1998), así como la inducción de respuestas específicas al estrés por herida y en las que se incluye la activación de vías específicas de señalización (Zhang y Klessig, 2001). Por lo tanto, se optó por el método de la infiltración que causó daños mínimos en la hoja, para asegurar que los cambios en los niveles de esfingolípidos se observasen en un sistema adecuado que eliminara la posibilidad de presentar efectos causados por trabajar en una hoja fisiológicamente alterada.

Las hojas de *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana* fueron expuestas a un solo tiempo de 2 h 30 min a la señal radioactiva, tiempo que resultó suficiente para que la señal de algunas especies de esfingolípidos fuera perceptible en la película de autorradiografía; no así con los embriones de maíz en los que tuvo que explorarse tanto el tiempo de exposición a L^{[3]H} (G)] serina con respecto a la germinación, como el tiempo que ésta permanecería en contacto con las semillas; para ello se tomó como referencia la cinética de toma de agua de embriones de maíz como indicador fisiológico del metabolismo. Según se informa en la literatura, la fase II de la cinética de absorción de agua corresponde a la activación metabólica (Krokida *et al.*, 2003), por lo que las enzimas que participan en la síntesis *de novo* de esfingolípidos responsables de incorporar la L^{[3]H} (G)] serina suministrada de manera exógena, podrían incorporar el aminoácido radiactivo eficientemente al metabolismo de esfingolípidos durante este periodo. El lapso de tiempo elegido para llevar a cabo los ensayos de incorporación de serina fue de las 19 a las 25 h, ya que en este periodo (que incluía a la fase II de la cinética de absorción de agua) se dió un

incremento acelerado en la toma de agua que proporcionaría una vía de acceso a la serina radiactiva.

Una vez establecido el periodo de exposición a $L[{}^3\text{H}(\text{G})]$ serina durante la germinación de los embriones de maíz, se evaluó el periodo en el que los embriones estarían en contacto con el aminoácido radiactivo. Se probaron tiempos de 2, 4 y 6 h a partir de las 19 h de imbibición. De estos tiempos se seleccionó el de 4 h basándonos en la intensidad de algunas bandas de esfingolípidos putativos presentes en la autorradiografía proveniente de extractos de maíz expuestos a $L[{}^3\text{H}(\text{G})]$ serina en los tiempos antes descritos. Este análisis sugirió que 2 h de exposición no eran suficientes para que la serina se incorporara al metabolismo de esfingolípidos, ya que la intensidad de las bandas presentes en la película de autorradiografía se vio disminuida en el caso de las 6 h. A tiempos largos de exposición a serina radiactiva, la disminución en las bandas marcadas probablemente se debió a que los precursores se van incorporando a esfingolípidos complejos que no pueden ser detectados o bien a que aquellos compuestos que fueron marcados, son degradados. De este modo, las 4 h de exposición a $L[{}^3\text{H}(\text{G})]$ serina fue el tiempo con mejores resultados en cuanto a la mayor intensidad de las bandas marcadas. Sin embargo, un experimento típico de incorporación de un precursor a una vía metabólica debe incluir la adición del precursor marcado como un pulso, es decir, una adición rápida y corta, así como una detección a varios tiempos secuenciales (Suzuki y Suzuki, 1972). Éstas condiciones no pudieron ser satisfechas en este estudio, dadas las limitaciones en el costo de la serina y en la baja incorporación de la serina marcada a los embriones de maíz en especial, ya que éstos demandaron grandes cantidades de serina para dar una señal visible en la CCF. Sin embargo, las condiciones establecidas nos permitieron explorar los efectos de la toxina FB1 en el metabolismo de los esfingolípidos.

Para ejemplificar el punto del párrafo anterior sobre la baja eficiencia de los embriones para incorporar a la serina marcada, hay que mencionar que se probaron diferentes concentraciones de $L[{}^3\text{H}(\text{G})]$ serina; al exponer embriones de maíz a 40 y 100 μCi no se logró la detección de ningún intermediario, por lo que la concentración se llevó hasta los 200 μCi de serina tritiada. En este caso, se logró la detección de algunas bandas en película de autorradiografía con un tiempo revelado de 17 días. Con el fin de acortar el tiempo de exposición e incrementar el marcaje, la concentración de serina radiactiva se llevó hasta los 400 μCi , concentración que finalmente resultó ser adecuada por permitir una buena detección de diferentes especies lipídicas sin que esto conllevara un tiempo de revelado muy largo.

De forma similar sucedió con hojas de frijol, que al ser infiltradas con una concentración de 100 μCi de $\text{L}[\text{}^3\text{H (G)}]$ serina, se logró la detección de algunas bandas que para ser observadas requirieron de un tiempo de revelado de la película de autorradiografía muy largo; al incrementar la concentración del aminoácido radiactivo a 200 μCi , el tiempo de exposición se acortó y el número de bandas se incrementó e intensificó. La única concentración de $\text{L}[\text{}^3\text{H (G)}]$ serina probada en *A. thaliana* fue de 160 μCi , la cual resultó suficiente para observar algunas bandas en película de autorradiografía. El tiempo de exposición de las placas cromatográficas continúa siendo una desventaja en los ensayos realizados en *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*, asimismo, el costo de estos experimentos impidió seguir probando diferentes condiciones como la de conocer la concentración óptima del aminoácido radiactivo al que debían ser expuestas las hojas de estas especies; sin embargo los resultados obtenidos hasta el momento arrojan datos valiosos que pueden ser considerados para experimentos posteriores.

8.4. Identificación de compuestos esfingoideos detectados en autorradiografía

Una vez que se logró la detección de una señal en la autorradiografía, se procedió a la identificación de las bandas detectadas para saber si alguna de ellas correspondía a compuestos esfingoideos. Tres consideraciones importantes que sugerían que la presencia de estos compuestos fuera posible en las placas cromatográficas son: a) el proceso de extracción lipídica de los tejidos vegetales empleados está diseñado para purificar compuestos esfingoideos preferencialmente, b) las bandas detectadas se separan en CCF con una fase móvil diseñada para esfingolípidos y c) los compuestos detectados en película de autorradiografía incorporan serina a su estructura como es el caso de los esfingolípidos.

Adicionalmente, la identificación de BCL presentes en el extracto lipídico de embriones de *Zea mays* de manera más directa se hizo por medio de la correlación de los Rf. de las bandas con Rf. de 0.5 y 0.15 con la de estándares conocidos y que resultaron ser los correspondientes a fitoesfingosina y esfingosina. Aunada a esta evidencia, la cinética que presentaron las bandas identificadas como fitoesfingosina y esfingosina y la de Rf. de 0.25, fue la esperada para una BCL en presencia de FB_1 , lo cual apoya la identificación de estos compuestos esfingoideos en el extracto lipídico de embriones de *Zea mays*.

Sin embargo, estas pruebas complementarias que confirmaran la identidad de esta banda como una BCL se enfocaron en la identificación de la banda con Rf. de 0.25, ya que no logró ser caracterizada con ninguno de los estándares disponibles comercialmente. Para ello se realizó un ensayo con miriocina que tuvo por objetivo la inhibición de la síntesis *de novo* de

esfingolípidos (el compuesto inhibe la actividad de la SPT, Young *et al* 2002), y con ello posiblemente causaría una disminución de algunas bandas que podrían aumentar en presencia de FB₁. A este respecto, se logró la desaparición de la banda con Rf. de 0.25 que no correspondía a ningún estándar disponible. De ésta misma banda se realizó un análisis por medio de CLAR, en el cual se logró la detección de tres picos con tiempos de retención de 4.69, 5.543 y 7.563 cuando se incluyó el NDA en la reacción de derivatización (en la cual hay una reacción del grupo amino libre de las bases de cadena larga (Gómez, 1994)), no así cuando el NDA no era incluido, lo que sugiere que los tres son compuestos esfingoideos en la muestra. Con el mismo fundamento de la reactividad del grupo amino libre, se realizó una tinción de la cromatoplaque de CCF con ninhidrina (Junya *et al.*, 1998) y bajo la cual se detectaron las bandas con Rf. de 0.25 y 0.05. En conjunto, estos datos sugieren que la banda marcada radiactivamente y con Rf. de 0.25 corresponde a una BCL.

8.5. Efecto de la FB₁ en la síntesis *de novo* de esfingolípidos

El efecto de la FB₁, en la síntesis *de novo* de esfingolípidos, resultó similar en los tres experimentos realizados con embriones de maíz expuestos por diferentes tiempos a la micotoxina. En todos los casos, la banda con Rf. de 0.25 y las identificadas como fitoesfingosina y esfingosina aumentaron sus niveles en presencia de FB₁. Sin embargo, la cinética de acumulación observada en presencia de la micotoxina en los tres experimentos independientes sólo fue reproducible a las 2 y 4 h en las bandas de fitoesfingosina y esfingosina con un aumento muy marcado y con respecto a la banda con Rf. de 0.25, se observaron claramente aumentos a las 2, 4 y 12 h. Los tiempos de 0.5 y 6 h mostraron variabilidad en los tres experimentos independientes, quizás debido a cuestiones técnicas como diferencias en los rendimientos de extracción de estas muestras en los diferentes ensayos y/o a las diferencias fisiológicas presentes en las diferentes poblaciones de embriones con las que se trabajó en estos experimentos. Esta última posibilidad es pertinente en particular en la muestra de 0.5 h, ya que los embriones de maíz fueron sometidos al análisis después de cumplir un tiempo muy corto de germinación, por lo que cualquier retraso o alteración fisiológica repercutiría en gran medida en los niveles endógenos de esfingolípidos, sujetos a la actividad de las enzimas participantes en la ruta de biosíntesis de esfingolípidos presente en los embriones y a que la maquinaria de síntesis y los niveles endógenos de esfingolípidos presentes en su mayoría, están siendo creados *de novo*.

En comparación con informes obtenidos en nuestro laboratorio en los que se logró la detección de fitoesfingosina y esfinganina en embriones de maíz expuestos a FB₁, en

condiciones de 24 h de germinación en presencia de 20 μ M FB₁ (Rivas, 2001, Gutiérrez, 2005) y 12 h de germinación más 12 h de exposición a 20 μ M FB₁ (Sánchez, 2006), en el presente trabajo las bases halladas fueron fitoesfinganina y esfingosina. Estas variantes pueden deberse: a) los métodos de detección por CLAR utilizada en los informes mencionados y el de CCF utilizado en el presente trabajo; ya que puede haber diferencias en la sensibilidad con respecto a la detección de BCL y b) los tiempos de exposición temprana a FB₁ desde las 0 y 12 h de germinación a diferencia del tiempo de 23 h de germinación anterior a la exposición con FB₁ llevado a cabo en el presente trabajo.

El estado fisiológico del embrión con respecto al tiempo de germinación representa una diferencia significativa en la acumulación de esfinganina, ya que al inhibir la síntesis *de novo* en tiempos cortos de germinación es probable que la vía de síntesis sea interrumpida en la formación de esfinganina a diferencia de cuando se interrumpe la síntesis *de novo* vía FB₁ en un estado fisiológico posterior como el de las 23 h de germinación, ya que a tiempos más largos la esfinganina puede desviarse a la formación de productos como la base fosforilada o a la hidroxilación. En este último caso, la esfinganina puede ser sustrato de una 4-hidroxilasa para producir fitoesfingosina (Sperling *et al.*, 2006). También la esfinganina puede sufrir insaturaciones posteriores para dar lugar a BCL insaturadas como la esfingosina. Aparentemente, los resultados del presente trabajo sugieren que la formación de especies derivadas de la esfinganina sucede a tiempos más largos en la síntesis *de novo*, a diferencia de los realizados en tiempos más cortos, en los que se detectó una mayor cantidad de esfinganina, ya que seguramente se requieren tiempos más largos para la síntesis de los derivados (Dunn *et al.*, 2004).

La producción de especies reactivas de oxígeno también está aumentada por acción de la FB₁, como lo indican investigaciones realizadas en nuestro laboratorio en un sistema similar al utilizado en este trabajo. En este sistema, los embriones de maíz fueron embebidos en medio de cultivo control por 22 h, posteriormente fueron transferidos a un medio con 20 μ M de FB₁ durante 3 h. La exposición dio como resultado un aumento del 106.4% en la reducción un indicador de especies reactivas de oxígeno con respecto al control, indicando un incremento en la producción del radical superóxido O₂⁻, mismo que se ha asociado a respuestas de defensa en plantas (Wojtaszek, 1997). La conexión molecular que tienen las BCL con estas respuestas de defensa no ha logrado ser dilucidada, tampoco se tienen claras las redes metabólicas que le siguen o le anteceden a la respuesta que dan los esfingolípidos en presencia de un patógenos,

sin embargo, sí se ha establecido recientemente que un aumento en las BCL endógenas es requerida para la producción aumentada de especies reactivas de oxígeno (Shi *et al.*, 2007).

8.7. Relación entre la cinética de acumulación de esfingolípidos sintetizados de novo y la activación de MAPquinas por efecto de la FB₁

En nuestro grupo de trabajo se detectó una MAPK de 45 kDa activada en presencia de FB₁ o de SN con una cinética de activación entre las 0.2 y las 24 h según el perfil temporal que se muestra en la Figura 26A, en donde se observa la activación de esta MAPK a diferentes tiempos, mostrando tiempos de alta activación y algunos otros con un nivel menor de activación. La Figura 26B representa la cinética de acumulación de BCL en presencia de FB₁ obtenida de tres experimentos independientes y que comparada con la curva de activación de la MAPK de 40 kDa presenta un perfil similar, apoyando la interacción entre la activación de la cascada de MAPquinas y la acumulación de BCL, según fue sugerido por los experimentos en los que la MAPK de 40 kDa se indujo por la exposición de los embriones de maíz a la FB₁ o a SN. Dado que esta toxina disminuye la actividad de la enzima esfinganina N-aciltransferasa provocando un aumento en los niveles endógenos de BCL, la relación entre el aumento de estos niveles y la activación de esta MAPK a tiempos coincidentes, se fortalece.

Si bien no se dispone de evidencias suficientes en este trabajo experimental para describir la interacción que existe entre estos dos elementos que independientemente han sido ampliamente relacionados con la respuesta a patógenos, puede hipotetizarse lo que sucede en la naturaleza en un caso típico de infección por *Fusarium verticillioides* a embriones de maíz, y que ha sido informada como recurrente en los campos cultivo (Mubantanhema *et al.*, 1999). Tras la infección, hay una baja en la actividad de la esfinganina N-acil transferasa provocada por la entrada de la micotoxina FB₁ suministrada por el hongo. Esto conduce a una acumulación en los niveles de BCL (Spassieva *et al.*, 2002). Tal aumento causaría, directa o indirectamente, la activación de una MAPKKK, que a su vez desencadenaría la activación corriente abajo de una MAPKK, y ésta, la de la MAPK de 40 kDa encontrada en nuestro laboratorio.

El mecanismo por el cual el aumento en las BCL puede inducir la activación de la MAPK no es claro, aunque existen informes en la literatura de que algunas MAPKKK poseen dominios de pleckstrina, esto resulta importante, si se considera que algunos lípidos que normalmente se encuentra en la membrana celular con función señalizadora (como los glicerofosfolípidos), tienen la capacidad de unirse a los dominios de pleckstrina (PH domains), y por ende de atraer a esas proteínas a la membrana, en donde llevan a cabo sus funciones efectoras (Quian, 1998).

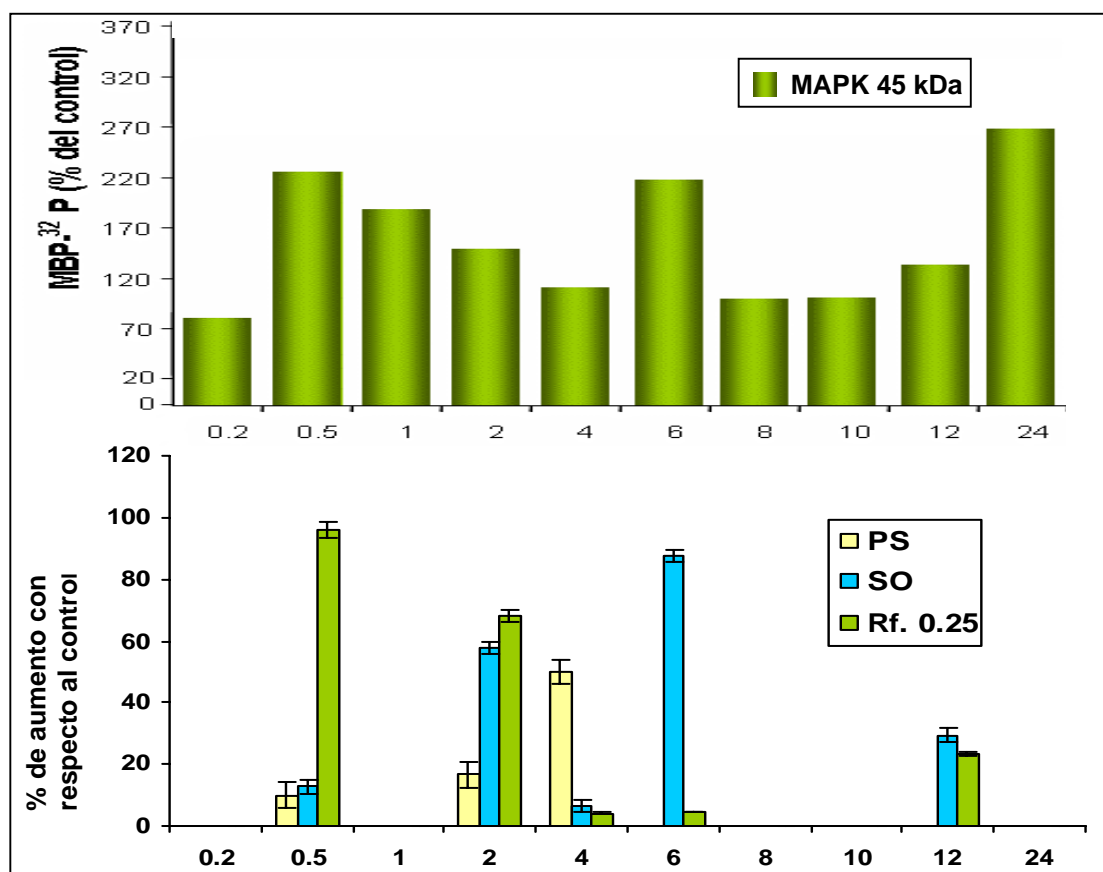


Figura 26. Comparación entre la cinética de acumulación de esfingolípidos sintetizados *de novo* y la de activación de una MAPK de 45 kDa. A) Se realizó un ensayo de fosforilación de MBP en gel por proteínas citosólicas de embriones de maíz expuestos 40 μ M de FB₁ en los tiempos indicados. El gel fue expuesto a película de autorradiografía a la que se le realizó un análisis densitométrico del cual se desprende la presente gráfica. B) Acumulación de bases de cadena larga con respecto al control. Se realizó una extracción lipídica tipo Markham *et al.*, (2006) de embriones de maíz expuestos a L[³H (G)] serina por 4 h y a FB₁ en condiciones análogas a las del experimento del panel A por los tiempos indicados. El extracto fue aplicado a placas de CCF eluidas con la fase móvil CHCl₃:CH₃OH:CaCl₂ 0.22 %, 80:18:2, (v:v:v) y expuestas a película de autorradiografía en las cuales se practicó un análisis densitométrico, en los tiempos determinados. La gráfica mostrada es resultado de tres experimentos independientes.

De este modo, el aumento en los niveles endógenos de BCL podrían mediar la cascada de MAP cinasas para que esta señal llegara al núcleo con el fin de promover por ejemplo, la transcripción de genes de defensa que tendrían por objetivo menguar el ataque del hongo y de este modo interactuar con el bioquímicamente luchando cada cual por la supervivencia. En el caso del *Fusarium verticillioides*, el hongo que produce la FB₁ y que es un necrótrofo, la estrategia sería aprovechar una de las tácticas de defensa de la célula hospedera, que es la de utilizar las BCL para inducir muerte celular programada, para obtener los nutrimentos de sobrevivencia. En el caso del ataque de organismos patógenos que no producen FB₁, la célula hospedera produciría incrementos en sus BCL para producir muerte celular programada conducente a la manifestación de la HR, una forma exitosa de defensa en plantas.

9. CONCLUSIONES

- ✓ Los protocolos desarrollados para marcar isotópicamente a las BCL endógenas a través de la incorporación de L[³H (G)] serina, tanto en embriones de *Zea mays* como en hojas de *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana* dieron buenos resultados.
- ✓ Con base en estos protocolos, se logró la detección de BCL en embriones de *Zea mays* y en hojas de *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*. En maíz, se identificaron la esfinganina y la fitoesfingosina.
- ✓ Se encontraron aumentos transitorios en los niveles endógenos de esfinganina, fitoesfingosina y de una BCL putativa con Rf de 0.25, tras la exposición de embriones de maíz a la FB₁ a lo largo del intervalo de 0.5 a 12 h..
- ✓ Todos los tiempos en los que se encontró un aumento en la acumulación de BCL coincidieron con tiempos de activación de una MAPK de 45kDa, presuntamente relacionada con respuestas de defensa en plantas (Saucedo, 2004).
- ✓ El resultado anterior y los antecedentes sobre la asociación de la acumulación de bases de cadena larga y las respuestas de defensa a patógenos, refuerzan que las BCL funcionan a modo de sensores o mediadores en la planta, dentro de un sistema de respuesta de defensa en la que participan la muerte celular programada (Shi *et al.*, 2007; Palacios, 2008), la pérdida en la integridad del DNA genómico (Alcántara, 1998), la producción de especies reactivas de oxígeno (Rodríguez, 2006) y la activación de MAPcinasas relacionadas con respuestas de defensa (Saucedo, 2004).

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adams J.** (2001) Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chemical Reviews*, **101**: 2271-2290.
- Abbas H, Tanaka T, Duke S, Poter J, Wray E.** (1994) Fumonisin and AAL-toxin induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiology*, **106**: 1085-1093.
- Agrios** (1997) *Plant Pathology*. Academic Press. San Diego, California. USA 4th ed. P.p. 73.
- Akinlaja J y Sachs F.** (1998) The breakdown of cell membranes by electrical and mechanical stress. *Biophysical Journal*, **75**: 247-254.
- Alessi D, Saito Y, Campbell D, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall C, and Cowley S.** (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO Journal*, **13**: 1610-1619.
- Alfano J y Collmer A.** (1996) Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. *The Plant Cell*, **8**: 1683-1698.
- Bohn M, Heinz E, Lüthje S.** (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **387**: 35-40.
- Boyes D, Nam J and Dangl J.** (1998) The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **26**: 15849-15854.
- Bradford M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Brisdelli F, Coccia C, Cinque B, Cifone MG, Bozzi A.** (2006) Induction of apoptosis by quercetin: different response of human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells. *Molecular Cell Biochemistry*, **296**: 137-149.
- Brodersen P, Petersen M, Pike H, Olszak B, Skov S.** (2002) Knockout of Arabidopsis ACCELERATED-CELL-DEATH11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes & Development*, **16**: 490-502.
- Carmel G, Leichus B, Cheng X, Patterson P, Mirza U, Chait B and Kuret J.** (1994) Expression, purification, crystallization, and preliminary x-ray analysis of casein kinase-1 from *Schistosaccharomyces pombe*. *The Journal of Biological Chemistry*, **10**: 7304-7309.
- Carrington J, Kristin D, Kasschau K, Sunita K, Mahajan B, and Schaad M.** (1996) Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell*, **8**: 1669-1681.
- Da Silva AL, Sperling P, Horst W, Franke S, Ott C, Becker D, Stass A, Lorz H, Heinz E.** (2006) A possible role of sphingolipids in the aluminium resistance of yeast and maize. *Journal of Plant Physiology*, **163**: 26-38.
- De Bondt H. L, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones H, Morgant D AND Sung-Hou K.** (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, **363**: 595 - 602
- Dixon R.** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.
- Echten-Deckert G.** (2000), Sphingolipid extraction and analysis by Thin-layer chromatography. *Methods in Enzymology*, **312**: 64-69.
- Fanger G, Gerwins P, Widmann C, Jarpe M, Johnson G.** (1997) MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Current Opinion in Genes & Development*, **7**: 67-74.
- Farmer E.** (2001) Surface-to-air signals. *Nature*, **411**: 854-856.
- Flores V, Raya P y Torres M.** (2005) Proteínas cinasas dependientes de Ca²⁺: características y activación. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM, Revista de Educación

Bioquímica **24**: 74-80.

Folch J, Lees M. and Stanley G. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, **226**: 497–505

Galyov E, Håkansson S, Forsberg A AND Wolf-Watz H. (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature*, **361**: 730-732.

Greenberg J, Silverman F, Liang H. (2000) Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the Arabidopsis mutant *acd5*. *Genetics*, **156**: 341-350

Grill E y Himmelbach A. (1998) ABA signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**: 412–418.

Gutiérrez N. (2005) Interacción de la Fumonisina B₁ con la membrana plasmática: Efectos en la bicapa lipídica y en la membrana plasmática. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.

Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud R. S, McLoughlin. M, Fuks Z and Kolesnick R.N. (1994) Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, **180**: 525-535

Hakomori S. (1990). Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**: 18713-18716.

Hannun Y. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, **274**: 1855-9.

Hanks S and Hunter T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **9**: 576-596.

Hanks S. y Quinn A. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods in Enzymology*, **200**: 38-62.

Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J, Sandhoff K. (2000) Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1485**: 63-99.

Imai H, Ohnishi M, Hotsubo K, Kojima M, Ito S. (1997) Sphingoid base composition of cerebrosides from plant leaves. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **61**: 351-353.

Imai H, Morimoto Y, Tamura K. J. (2000) Sphingoid base. Composition of monoglucosylceramide in Brassicaceae. *Journal of Plant Physiology*, **157**: 453–456.

Jackson O y Taylor C. (1996) *Plant-Microbe Interactions: Life and death at the interface*. *The Plant Cell*, **8**:1651-1668.

Johnson L, Noble M y Owen D. (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell Press*, **85**: 149-158.

Jonak C, Ligterink W, Hirt H. (1999) MAP kinases in plant signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**: 1420-9071.

Jouannic S, Hamal A, Leprince A, Tregear J, Kreis M, Henry Y. (1999) Plant MAP kinase kinases structure, classification and evolution. *Gene*, **11**: 1-11.

Junya M, Takeshi K, Shigeki F y Yoshio H. (1998) Exogenous l-serine is required for the synthesis of neuronal phosphatidyl-l-serine and sphingolipids. *The Journal of Biological Chemistry*, **31**: 19363-19366.

Katsuta J y Shibaoka H (1992) Inhibition by kinase inhibitors of the development and the disappearance of the preprophase band of microtubules in tobacco BY-2 cells. *Journal of Cell Science*, **103**: 397-405.

Kawaguchi M, Imai H, Naoe M, Yasui Y, Ohnishi M. (2000) Cerebrosides in grapevine

leaves: distinct composition of sphingoid bases among the grapevine species having different tolerances to freezing temperature. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **64**:1271-3.

Kawasaki T, Henmi K, Ono E, Hatakeyama S, Iwano M, Satoh H, Shimamoto K. (1999) The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **32**: 10922-10926.

Knighton D, Xuong N, Taylor S, Sowadski J. (1991) Crystallization studies of cAMP-dependent protein kinase. Cocrystals of the catalytic subunit with a 20 amino acid residue peptide inhibitor and MgATP diffract to 3.0 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, **20**: 217-220.

Knogge W. (1996) Fungal infection of plants. *The Plant Cell*, **8**: 1711-1722.

Koga J, Oshima K, Owaga M, Ogasawara N y Shimura M. (1998) A new bioassay for measuring elicitor activity in rice leaves. *Annals of Phytopathology Society, Japan*, **64**: 97-101.

Krokida M, Karathanos Z, Maroulis y Marinos-Kouris D. (2003) Rehydration kinetics of dehydrated products. *Journal of Food Engineering*, **57**: 1-7

Leprince A, Jouannic S, Hamal A, Kreis M, Henry Y. (1999) Molecular characterisation of plant cDNAs BnMAP4Kalpha1 and BnMAP4Kalpha2 belonging to the GCK/SPS1 subfamily of MAP kinase kinase kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **18**:1-13.

Liang H, Yao N, Song J. T, Luo S, Lu H and Greenberg J. (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes & Development*, **17**: 2636-2641.

Ligterink W, Hirt H. (2001) Mitogen-activated protein [MAP] kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *International Review of Cytology*, **201**: 209-75.

Lynch D and Peter L. (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiology*, **83**: 761-767.

Lynch D. (2000) Enzymes of sphingolipid metabolism in plants. *Methods in Enzymology*, **311**: 130-149.

Markham J, Jia Li, Cahoon E, Jaworski J. (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**: 22684-22694.

Markham J and Jaworski J. (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21**: 1304–314.

Mathieson F, Nixon G. (2006) Sphingolipids differentially regulate mitogen-activated protein kinases and intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle: effects on CREB activation. *British Journal of Pharmacology*, **147**: 351-9.

Mayer A and Poljakoff-Mayber A. (1989) *The Germination of Seeds*. Oxford, England. Pergamon Press, 4th ed. P.p. 270.

McDowell J. and Dangl J. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**: 79-82.

Merrill A. Jr., Schmelz E, Dillehay D, Spiegel S, Shayman J, Schroeder J, Riley R., Voss K y Wang E. (1997) Sphingolipids- The enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **142**: 208-225.

Schmelz E, Roberts P, Kustin E, Lemonnier L, Sullards M, Dillehay D, and Merrill A. (2001) Modulation of intracellular β-catenin localization and intestinal tumorigenesis *in vivo* and *in vitro* by sphingolipids. *Cancer Research*, **61**: 6723-6729.

Meskiene I y Hirt H. (2000) MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Molecular Biology*, **42**: 1573-5028.

Meskiene I and Hirt H. (2000) MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Molecular Biology*, **42**: 1573-5028.

- Mikoajczyk M, Awotunde O, Muszyńska G, Klessig D, and Dobrowolska G.** (2000) osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *The Plant Cell*, **12**:165-178.
- Mizoguchi T, Irie, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, and Shinozaki K.** (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**: 765-769.
- Morrison W y Hay J.** (1970) Polar lipids in bovine milk. II. Long-chain bases, normal and 2-hydroxy fatty acids, and isomeric cis and trans monoenoic fatty acids in the sphingolipids. *Biochimica et Biophysica Acta*. **5**: 460-467.
- Muñoz-Dorado J, Intuye S, and Intuye M.** (1991) A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell*, **67**: 995-1006.
- Ng C, Carr K, McAinsh M, Powell B, Hetherington A.** (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*, **410**: 596-599.
- Ng C y Hetherington A.** (2001) Sphingolipid-mediated signalling in plants. *Annals of Botany*, **88**: 957-985.
- Qian X, Vass W, Papageorge A, Anborgh P y Lowy D.** (1998) N Terminus of Sos1 Ras exchange factor: Critical roles for the dbl and pleckstrin homology domains. *Molecular Cell Biology*. **18**: 771-7778.
- Rivas M.** (2001) Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de los niveles de bases esfingoideas en ejes embrionarios de maíz expuestos a la fumonisina B₁. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- Rodríguez P.** (2006) Relación entre la actividad de la NADPH oxidasa, compuestos esfingoideos y respuesta a patógenos en células vegetales. Tesis de Licenciatura en Química. UNAM.
- Sánchez D.** (2006) Acumulación de bases esfingoideas durante la respuesta de defensa de maíz al patógeno *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.
- Sánchez S, Rodríguez R, González P, Bernal I y Gavilanes M.** (1992) Tonoplast and plasma membrane ATPases from maize lines of high or low vigour. *Seed Science Research* **2**: 105-111.
- Saucedo M.** (2004) Efecto de la Fumonisin B₁ y compuestos esfingoideos en la actividad de MAP cinasas en embriones de maíz. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- Seeger R and Krebs E.** (1995) The MAPK signaling cascade. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **9**: 726-735.
- Spassieva S, Markham and Hille J.** (2002) The plant disease resistance gene Asc-1 prevents disruption of sphingolipids metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant Journal*, **32**: 561-572.
- Sperling P. and Heinz E.** (2003) Plant sphingolipids: structural, diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1632**: 1-15.
- Shah J.** (2005) Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **43**: 299-60.
- Shiu S and Blecker A.** (2001) Receptmr-like iinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**: 10763-10768.

- Suzuki K, Yano A, and Shinshi H** (1999) Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. *Plant Physiology*, **119**: 1465-1472.
- Suzuki Y and Suzuki K.** (1972) Specific radioactive labeling of terminal *N*-acetylgalactosamine of glycosphingolipids by the galactose oxidase-sodium borohydride method. *Journal of Lipid Research*, **13**: 687-690.
- Taliansky M and Robinson D.** (1997) Trans-acting untranslated elements of groundnut rosette virus satellite RNA are involved in symptom production. *Journal of General Virology*, **78**: 1277-1285.
- Umemura K, Ogawa N, Yamauchi T, Iwata M, Shimura M, Koga J.** (2000) Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiology*, **41**: 661-667.
- Valcarcel M y Gómez A.** (1994) *Técnicas Analíticas de Separación*. 3th Ed. Reverté S.A. Madrid, España P.p. 237.
- Van Merr G, Lisman Q.** (2002) Sphingolipids transport: rafts and translocators. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 29.36.
- Webster J. (1980) *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press. Cambridge. 3th ed. P.p. 341.
- Wojtasen P.** (1997) Oxidative burst and early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, **322**: 681-692.
- Worrall D, Ng C, Hetherington A.** (2003) Sphingolipids, new players in plant signaling. *Trends in Plant Science*, **311**: 121-139.
- Wrzaczek M y Hirt H.** (2001) Plant MAP kinase pathways: how many and what for? *Biology of the Cell*, **93**: 81-87.
- Yang Z, Zhu Q, Luo K, Zhou Q.** (2001) The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature*, **15**: 317-322.
- Yao J y Rastetter G.** (1985) Microanalysis of complex tissue lipids by high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, **150**: 111-6.
- Young C, Zaworski G, Kobayashi D, Nagiec M.** (2002) Yeast sphingolipid bypass mutants as indicators of specific inhibitors of fungal sphingolipid biosynthetic pathway. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **42**: 27-30.
- Zhang H, Hannon G and Beach D.** (1994) p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive status. *Genes & Development*, **8**: 1750-1758.
- Zhang J, Jin N, Liu Y and Rhoades R.** (1998) Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **19**: 324-332.
- Zhang S y Klessig D.** (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science*, **6**: 520-527.
- Zwenger K y Hirt H.** (2003) Recent advances in plant MAP kinase signalling. *The Journal of Biological Chemistry*, **23**: 117-132.
- Initiative, T.A.G.** 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**: 796-815.

Apéndice I. Métodos de análisis de esfingolípidos

Para conocer el papel biológico y bioquímico de los lípidos, es necesario determinar su estructura y la proporción en la que se hallan dentro de la célula. El primer paso para su análisis es la extracción, que requiere de la utilización de compuestos orgánicos hidrofóbicos pero con cierta polaridad para solubilizar a los esfingolípidos que son anfipáticos, es por ello que los métodos de extracción de la mayoría de los compuestos celulares, que son polares y por lo tanto solubles en agua, deben modificarse. Los lípidos neutros pueden extraerse de los tejidos con solventes como el cloroformo o el benceno, ya que evitan la asociación de estos compuestos en estructuras moleculares como las micelas. Dado que la mayoría de los esfingolípidos pueden sumar un alto número de interacciones hidrofóbicas entre sí, es conveniente extraerlos con solventes apolares que contengan cierto grado de polaridad para debilitar las interacciones electrostáticas entre sí y entre ellos y las proteínas de membrana, lo cual es un impedimento crítico para la extracción de esfingolípidos de membrana (Higgins, 1987).

Una vez lograda la extracción puede procederse a la identificación molecular. La cromatografía de absorción y capa fina son procedimientos basados en la separación de las diferentes especies de lípidos, dependiendo de su carga; ambas distribuyen a la muestra lipídica en una fase polar insoluble como el ácido silícico, lo que provoca que los compuestos polares se fijen a dicho ácido, mientras que los compuestos polares viajan a través de los poros del sílice, ayudados por la acción de un disolvente que los solubilizan y arrastran. De esta manera, la migración diferencial dependiente de la carga de los compuestos en las diferentes regiones de la columna (cromatografía de adsorción) o de la placa (capa fina), ayuda a la identificación de cada especie lipídica. Posterior a esto, pueden adicionarse colorantes afines al lípido de interés para su posterior identificación. Para un análisis subsecuente pueden separarse los lípidos de la cámara o de la placa y recuperarse con una segunda extracción utilizando un disolvente orgánico (Higgins, 1987).

El análisis de esfingolípidos más complejos se apoya en la hidrólisis específica, método basado en la ruptura de enlaces específicos por medio de lipasas que hidrolizan los enlaces hallados en fosfoesfingolípidos que a su vez producen derivados que pueden identificarse por cromatografía, permitiendo no sólo la identificación del lípido, sino la determinación de su estructura (Morrison y Hay, 1970); aunque si lo que se desea es determinar de manera más exacta la estructura lipídica, entonces debe recurrirse a la cromatografía de gases combinada

con la espectrometría de masas que requieren la volatilización de los lípidos o sus derivados para el análisis molecular de su fragmentación (Higgins, 1987).

Apéndice II. Características del material y de los compuestos utilizados.

a) Imbibición de embriones con L-[³H (G)] serina y Fumonisina B₁.

Material.

- Cajas para cultivo de tejidos (35 × 10 mm).
- Caja de Petri 50 × 20 mm).
- Haza de vidrio.

Reactivos

- Solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 10% preparada a partir de una solución comercial 5.55 de cloro activo.
- Buffer de imbibición (sacarosa 2%, 50 mM (KCl), 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM de (MgCl₂)).
- Agarosa.
- Solución concentrada de FB₁ 1 mM (Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri) disuelta en acetonitrilo.
- Solución de L-[³H (G)] serina (Pepkin Elmer) 1mCi-mL disuelta en una solución de etanol/agua (2:98).

b) Homogeneización del tejido vegetal.

Material.

- Mortero con pistilo.
- Homogeneizador Tissue Tearor modelo 985-370.

Reactivos.

- N₂ liq.
- Buffer de homogeneización (Sorbitol 250mM, HEPES/BTP 50mM a pH 7.8, DTE 5mM, EDTA 1mM, KCl 1mM, NaF 1mM y Na₁VO₄ 1mM,

c) Cuantificación de proteína por el método de Bradford, 1976.

Reactivos.

- Fracción microsomal.
- Reactivo Protein assay (Bio-Rad Laboratorios).
- Buffer de homogeneización (sorbitol 250mM, HEPES-BTP 50mM a pH 7.8, DTE 5mM, EDTA 1mM, KCl 1mM, NaF 1mM y Na₃VO₄ 1mM.
- Bovine serum albumine (BSA).
- Agua desionizada.

d) Extracción por el método de Folch.

Reactivos.

- Esfingomielina proveniente de cerebro de bovino (Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri).
- Fracción microsomal.
- Solución salina isotónica (NaCl 0.9% disuelto con agua).
- Metanol-BHT.
- Cloroformo-BHT (preparado con hidroxitolueno butilado al 0.002%).
- Metanol-BHT (preparado con hidroxitolueno butilado al 0.002%).
- Na₂SO₄.
- N₂ gas.

e) Hidrólisis básica.

Reactivos.

- Esfingomilina proveniente de cerebro de bovino (Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri).
- Ba (OH)₂ 10% en H₂O (p:v).
- Fracción microsomal.
- Dioxano.
- (NH₄)₂SO₄ 2% en agua (p:v).
- Dietil-éter.
- N₂ gas.

f) Extracción tipo Markham *et al.*, 2006.

Material.

- Mortero con pistilo.
- Homogeneizador tipo DUALL.
- Tubo tipo Pirex.

Reactivos.

- N₂ liq.
- Solvente "H" (propanol: hexano: agua, 55: 20: 25; v/v/v) (mezclar los reactivos hasta que se dividan en dos fases y tomar la superior)
- Esfingomilina proveniente de cerebro de bovino (Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri).
- N₂ gas.

- Metanol.

g) Separación e identificación por TLC de los intermediarios de la síntesis *de novo* de esfingolípidos marcados y no marcados con L-[³H (G)] serina.

Material.

- Placa de aluminio con recubrimiento de sílica tipo F₂₅₄ con poro de 60Å.
- Cámara de vidrio de 17.5 × 16.5 × 8.2 cm tipo Aldrich.

Características de los reactivos utilizados como estándares.

- Esfingomielina (Em), proveniente de cerebro de bovino, N-Acil-4-esfingenin-1-0-fosforilcolina. (Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri). Cantidad aplicada: 10 nmoles.
- Esfinganina (SN), DL- Eritro-Dihidroesfingosina. Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri. P.M: C₁₈H₃₉NO₂, P.M: 301.5 g/mol. Cantidad aplicada: 10 nmoles.
- Fitoesfingosina (PS), (Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri). P.M: C₁₈H₃₉NO₂, P.M: 354.0 g/mol. Cantidad aplicada: 10 nmoles.
- Esfingosina (SO), Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri. F.M: C₁₈H₃₇NO₂, P.M: 299.5 g/mol. Cantidad aplicada: 10 nmoles.
- Ceramida 18 (C_{18:0}), N- esteaoroil-D-eritro-esfingosina. Avanti Polar Lipids. Inc., Alabaster, Alabama. P.M: 565.96 g/mol. Cantidad aplicada: 10 nmoles.
- Glucosil ceramida (Glc), ceramida β-D-galactósido, galactocerebrósido de bovino. (Sigma Chemicals, Co., St. Louis Missouri), P.M: 812.26 g/mol. Cantidad aplicada: 10 nmoles.

h) Composición de soluciones reveladoras

Técnica de revelado con Cu: Sulfato de cobre pentahidratado 15.6 g, 9.4 mL de Ácido fosfórico 85 % en agua (w/v), aforar a 100 mL con H₂O.

Técnica de revelado con Ninhidrina: 0.25 g de ninhidrina disuelta 80 mL de n-butanol, aforar a 100 mL con ácido acético al 100 %..

h) Exposición de la placa de TLC a película fotográfica.

Material.

- Cassete para revelado.
- Film de autorradiografía X-Omaet sensibles al azul, marca Kodak.

Reactivos.

- Solución reveladora GBX al 18% (diluir 103 mL en 473 mL de agua).
- Solución fijadora GBX al 18% (diluir 103 mL en 473 mL de agua).