

00562

3
25



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

Efecto de la fumonisina B1 sobre la
ATPasa de H^+ de la membrana
plasmática de embriones de maíz.

T E S I S
Que para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS
p r e s e n t a

Q. Nora Andrea Gutiérrez Nájera



México, D. F. [REDACTED]

1999

273135

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

La presente tesis se realizó en el Laboratorio 101 del departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM. El proyecto fue apoyado por DGAPA (IN204097) y CONACYT (25131-B).

Jurado asignado:

Presidente **Dra. Marieta Tuena de Gómez-Puyou.**

Vocal **Dr. Rafael Moreno Sánchez.**

Secretario **Dr. Blas Lotina Hensen.**

Suplente **Dr. Javier Plasencia de la Parra.**

Suplente **Dr. Gerardo Gamba Ayala.**

Directora de tesis: _____
Dra. Marina Gavilanes Ruíz.

Sustentante: _____
Q. Nora Andrea Gutiérrez Nájera.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco profundamente a Jehová Dios por la vida y la oportunidad de conocer parte de su maravillosa creación.

A mis padres (Avelina y Roberto) a quienes ningún día dejo de agradecer el privilegio de haberme dejado nacer y crecer hasta este momento, quienes sin su ayuda no hubiera llegado hasta aquí.

A mis hermanos (Diana, Lorena y Roberto) por ser compañeros más que sólo hermanos.

A la Dra. Marina Gavilanes, el Dr. Javier Plasencia y la Dra. Sobeida Sánchez con quienes he aprendido mucho gracias a su valiosa asesoría en este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio 101 (Chelo, Vivi, Luis, Manuelita, Andrea y Maru) por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de facultad (Lilí, Maira, Maripaz, Mary Ricardo, José Luis y Gerardo) quienes siempre se acuerdan de mi y a pesar del paso del tiempo y las circunstancias nunca me dejan de brindar su amistad.

De todos ellos he podido aprender la verdad de un sabio proverbio: “He llegado saber que no hay nada mejor para los hombres que regocijarse y hacer el bien durante la vida de uno, y también que todo hombre coma y realmente beba y vea el bien por todo su duro trabajo. Este es el don de Dios”. (Eclesiastés 3:12,13)

RESUMEN

La fumonisina B₁ es la más abundante de las fumonisinas las cuales son producidas por el hongo *Fusarium moniliforme* un hongo que se presenta como contaminante del grano de maíz almacenado. Esta toxina inhibe a la ceramida sintasa en la vía de biosíntesis de esfingolípidos resultando en un aumento en la cantidad de bases esfingoideas libres en la célula. Se ha observado que FB₁ tiene efectos adversos en el establecimiento de la plántula de semillas de maíz, así como en la elongación radicular durante la germinación de éstas. En plantas, la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es un objetivo para varias toxinas microbianas. El propósito del presente trabajo fue establecer los efectos de FB₁ sobre la actividad ATPasa de H⁺ de embriones de maíz. Se midió la fuga de electrolitos de embriones embebidos en presencia de 10 y 20 µM como una prueba del efecto de la toxina sobre la membrana plasmática y se obtuvo que hubo de un 61-80% de incremento en la fuga de electrolitos con esas dos dosis al comparar con la fuga de electrolitos del embriones control, sugiriendo que la FB₁ incrementó la permeabilidad de las membranas embrionarias. Los efectos de FB₁ sobre la ATPasa de la membrana plasmática se realizaron tanto *in vivo* como *in vitro*. Los resultados de ambos experimentos muestran que la FB₁ inhibe la hidrólisis de ATP de la ATPasa de H⁺ de un 23-43%. El tipo de inhibición de la FB₁ sobre la ATPasa de H⁺ fue del tipo acompetitivo (K_i = 10.5 µM).

ÍNDICE

RESUMEN	i
ÍNDICE	ii
ABREVIATURAS	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Infección de plantas por hongos.	
1.1.1 Efectos macroscópicos.	
1.1.2 Efectos celulares.	
1.1.2.1 Estimuladores y supresores.	
1.1.2.2 Enzimas hidrolíticas.	
1.1.2.3 Toxinas.	
1.1.2.3.1 La fumonisina B₁.	
1.1.2.3.1.1 Estructura.	
1.1.2.3.1.2 Mecanismo.	
1.1.3 Inducción de la producción de metabolitos por la planta.	
1.1.3.1 Fitoalexinas.	
1.2 La membrana plasmática en plantas.	
1.2.1 Estructura y composición.	
1.2.1.1 Composición lipídica.	
1.2.1.2 Composición polipeptídica.	
1.3 La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.	
1.3.1 Estructura y función.	
1.3.2 Funciones fisiológicas.	
1.3.3 Regulación de la ATPasa de H⁺.	
1.3.3.1 Modulación de la actividad de la enzima por: fosfolípidos, auxina, luz, y cinasas.	
1.3.3.2 Modulación de la actividad de la ATPasa por toxinas bacterianas y de hongos.	
1.3.3.3 Regulación de la expresión génica.	
2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1 Material biológico.	
4.2 Imbibición de embriones.	

- 4.3 Determinación del porcentaje de germinación.
- 4.4 Medición de conductancia eléctrica en embriones de maíz enteros.
- 4.5 Obtención de las vesículas de membrana plasmática.
- 4.6 Medición de la actividad de hidrólisis de ATP.
- 4.7 Determinación de fosfato inorgánico.
- 4.8 Determinación de la concentración de proteína.
- 4.9 Cálculo de las concentraciones de sustrato.
- 4.10 Análisis cinético.

5. RESULTADOS	34
6. DISCUSIÓN	48
7. CONCLUSIONES	55
8. BIBLIOGRAFÍA	56

ABREVIATURAS

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

EDTA: Sal tetrasódica del ácido etilendiaminotetraacético.

ATP: Trifosfato de adenosina

DTE: Ditioneóritol.

DTT: Ditioneóritol.

TPCK: N- α -p-tosil-lisina-cloro-metilcetona.

TLCK: N-tosil-fenil-alanina-cloro-metilcetona.

PEG: polietilenglicol.

U₁: fase superior del primer reparto de fases en dos polímeros.

L₁: fase inferior del primer reparto de fases en dos polímeros.

SDS: Dodecilsulfato de sodio

DOC: Desoxicolato de sodio.

CTC: Solución de cobre-tartrato-carbonato.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Infección de plantas por hongos.

Los hongos constituyen un grupo muy versátil de organismos eucarióticos heterótrofos de carbono. Algunos de ellos se han especializado en colonizar plantas y pueden ser divididos en tres grandes categorías dependiendo de las bases de sus relaciones nutricionales con el hospedero: biótrofos, necrótrofos y hemibiótrofos. Los necrótrofos causan daño extenso al tejido y derivan su nutrición de células muertas o moribundas. Los biótrofos derivan nutrientes de la célula hospedera viva y causan daño menor al tejido durante las etapas tempranas de la infección. Algunos hongos que exhiben una corta fase biótrofa de desarrollo antes de obtener nutrientes necrotróficamente se les da el nombre de hemibiótrofos (Clarkson, 1992).

La gran mayoría de los hongos es estrictamente saprófita; un 10% de las aproximadamente 100,000 especies fungales conocidas es capaz de colonizar plantas, y una fracción más pequeña de éstos es capaz de causar enfermedad. Entre los organismos causantes de enfermedades infecciosas de plantas en cosecha, el agente patogénico fúngico tiene un papel relevante al causar epidemias devastadoras, que se traduce en cuantiosas pérdidas económicas por la destrucción de plantas creciendo en amplias superficies (Knogge, 1996).

Las especies de plantas conocidas que producen flores, aproximadamente 300,000, son atacadas por hongos patogénicos. Sin embargo, una planta puede ser hospedera de solo unas pocas especies de hongos, y de manera similar, la mayoría de los hongos puede tener un rango limitado de hospederos. En la mayoría de los casos, el desarrollo de una enfermedad (no-resistencia o susceptibilidad) en plantas superiores es el resultado de una interacción específica entre el hospedero, el patógeno y las condiciones ambientales. Los efectos producidos por el patógeno sobre su hospedero se pueden clasificar en efectos macroscópicos, aquellos observados a simple vista o en efectos celulares que son de mayor complejidad a nivel celular y molecular (planta en cultivo).

1.1.1 Efectos macroscópicos.

a) Crecimiento reducido: El efecto más importante de una enfermedad en una cosecha es la disminución en su producción. Esto es debido al daño en órganos específicos, tales como las hojas, aunque comúnmente se asocia con una disminución del crecimiento de la planta entera. Cuando un patógeno está involucrado en la enfermedad, el bajo crecimiento se debe a la capacidad reducida de toma de agua y solutos del suelo, por los efectos del patógeno en la raíz o por un biótrofo, el cual reduce la velocidad de asimilación de metabolitos o produce toxinas que interfieren con el metabolismo hospedero en alguna otra manera.

1. INTRODUCCIÓN

b) Muerte generalizada: En muchas de las enfermedades económicamente más importantes la planta muere rápidamente. Esto puede ser debido a uno o más tipos de mecanismos, como los siguientes:

1. - Malogro (Dampin-off). Es causado por patógenos que matan las células con las que están en contacto cercano y que se distribuyen a través de toda la planta por mecanismos diversos o por medio de múltiples infecciones.

2. - Malogro de la plántula por enfermedad debido a condiciones húmedas. El daño más importante en tales enfermedades se da en las plántulas, ya que las raíces y la base del tallo son infectadas por hongos patógenos necrotrofos los cuales entran a través de heridas o a través de cutículas delgadas como las que poseen las plántulas, esto es, cuando el crecimiento transcurre en humedad y en condiciones de iluminación baja. Estos patógenos no son especializados, la mayoría de ellos son productores de enzimas pectolíticas y causan muerte local y colapso de los tejidos infectados.

c) Marchitamiento. En enfermedades que presentan este tipo de síntoma, la planta hospedera se marchita debido a la carencia de turgor en las hojas y en otros órganos herbáceos. Tal pérdida de turgor puede tener muchas causas de tipo mecánico o bioquímico. Los patógenos que producen mayormente enfermedades por marchitamiento son los hongos. El marchitamiento causado por ataque patogénico es irreversible.

d) Pudrición de la parte inferior y raíces de la planta. Lo que se observa en las plantas que presentan este síntoma es que las partes de la planta en el nivel basal o por debajo de ésta se pudren.

e) Antracnosis y costras. El término antracnosis es aplicado a una enfermedad donde el patógeno es un ascomiceto o un hongo imperfecto que produce lesiones negruzcas, donde se acumulan esporas negras, micelio o ambos. Este síntoma de antracnosis es acompañando algunas veces por la presencia de lesiones parecidas a costras levantadas.

f) Manchas en las hojas. Las manchas y la presencia de pequeñas áreas necróticas es un síntoma de enfermedad que se presenta extensamente. Hay muchas enfermedades con manchas en las hojas producidas por hongos, principalmente por ascomicetos u hongos imperfectos.

g) Canker. Un canker puede ser definido como una lesión en la cual un área de necrosis, causada por el patógeno, se extiende lentamente, debido a que el crecimiento patogénico es lento, siendo reprimido en intervalos por sobre-crecimiento del hospedero, o a una combinación de estas dos circunstancias. La mayoría de los cankers ocurren en plantas leñosas.

h) Deformaciones hiperplásticas. Las deformaciones se inducen por la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento por el patógeno y la estimulación inducida por el patógeno de dichas sustancias en el hospedero. Algunos ejemplos de tales deformaciones

1. INTRODUCCIÓN

son las asperezas o deformación de tejidos ya existentes como un alargamiento del tallo, enroscamiento y distorsiones en las hojas causadas por una pocas especies de hongos, deformación de órganos florales, crecimiento de raíces en la base del tallo, etc. (Manners, 1982).

1.1.2 Efectos celulares.

En las etapas muy tempranas de la infección por hongos biótrofos hay un flujo normal de nutrientes de la hoja no infectada hacia el hongo, éstos pueden ser suficientes para el desarrollo y reproducción del patógeno. Sin embargo, a medida que la población del hongo se incrementa, hay una redirección de los flujos de nutrientes del hospedero hacia el patógeno. Lo que resulta de la infección es una reducción en carbohidratos solubles, un incremento en la acumulación de almidón, y un incremento en la fijación de CO₂ en aminoácidos, ácidos orgánicos y proteína en el hospedero. Las alteraciones en el transporte y metabolismo de carbohidratos en la hoja infectada dependerán del tipo de patógeno. La infección puede ser acompañada por cambios en la fotosíntesis. Inicialmente la fotosíntesis se ve mejorada (por unidad de clorofila), sin embargo la mayoría de los sistemas fotosintéticos por unidad de área decrece (aunque la fotosíntesis por concentración de clorofila permanece alta), finalmente la clorofila disminuye en el tejido a medida que la infección progresa. La velocidad de respiración del hospedero se incrementa en respuesta a la infección. La nutrición por nitrógeno puede también influir la respuesta a la infección. Aunque estos efectos generales están bien documentados, la secuencia precisa de los eventos y los mecanismos de éstos están pobremente entendidos (Leegood y Scholes, 1992).

Sin embargo, se han aislado algunos factores de patogenicidad y se han estudiado los mecanismos utilizados por la planta para reconocer al invasor microbiano e iniciar una respuesta de defensa. A pesar de esto, aún no es claro cuales componentes bioquímicos son fundamentales para el proceso. Se han podido distinguir dos tipos de respuesta de resistencia de la planta a patógenos potenciales: la respuesta de resistencia no-hospedera (frecuente) y la respuesta de resistencia hospedera específica de raza o cultivar (comparativamente rara). Esta última está genéticamente definida por la interacción directa o indirecta entre el producto de un gen de resistencia (R) dominante o semidominante del hospedero y el producto complementario del gen de avirulencia (*avr*) dominante del patógeno. Este tipo de resistencia se presenta dependiendo de los genotipos que interaccionen. En contraste, la resistencia no-hospedera (incompatibilidad básica) se exhibe en todas las especies de plantas que responden a patógenos potenciales sin combinaciones de R/*avr*. Aparte de esta distinción, sin embargo, los procesos bioquímicos que ocurren en la resistencia hospedera y no-hospedera son muy similares.

El primer evento para que se presente una respuesta de defensa efectiva es el reconocimiento rápido de un invasor potencial, el cual se realiza por moléculas señal específicas del patógeno o derivadas de la pared celular, denominados estimuladores (elicitors).

1. INTRODUCCIÓN

1.1.2.1 Estimuladores y supresores.

El término estimulador (elicitor) se usó originalmente para referirse a moléculas y otros estímulos que indujeran la síntesis de fitoalexinas en células de las plantas, pero ahora el término es usado para describir moléculas que estimulan alguna de las respuestas de defensa observadas.

Poco después del contacto con una planta, los patógenos son detectados por la planta y confrontados con el sistema de defensa activa. Una respuesta de defensa exitosa debe estar basada en un sistema efectivo que haga posible un pronto reconocimiento de la amenaza y, como una consecuencia, la activación del sistema de defensa específico que actúa para prevenir el desarrollo fungal posterior. Los patógenos exitosos, por otro lado, necesitan neutralizar la estrategia de defensa de la planta.

Las bases moleculares para el reconocimiento de patógenos potenciales por las plantas, fuera de los sistemas gen por gen, son pobremente entendidos. Las plantas pueden reconocer a un agresor a través de factores que están presentes en la superficie fungal (fragmentos de quitina y glucano) o que son secretados por el patógeno (proteínas), y/o a través de determinantes de sí mismas, tales como fragmentos de pared celular de la planta (oligogalacturonatos), que son liberados por un patógeno invasor a través de la actividad de enzimas hidrolíticas. Después del reconocimiento del patógeno, se inician una multitud de reacciones asociadas a la resistencia de la planta: flujos iónicos a través de la membrana de la planta por la apertura de canales iónicos específicos, generación de especies de oxígeno muy reactivas (explosión oxidativa), tales como $\cdot O_2^-$, H_2O_2 y $\cdot OH$, probablemente vía la acción de oxidasas de NAD(P)H asociadas a membrana y/o a peroxidasas localizadas en el apoplasto; fosforilación de proteínas específicas, activación de enzimas involucradas en el reforzamiento de la pared celular y activación transcripcional de numerosos genes de defensa. La identificación de muchos de los genes de respuesta a estimuladores ha revelado su participación en varias vías bioquímicas de metabolismo primario y secundario. Debido a la gran diversidad metabólica, es extremadamente difícil asegurar las contribuciones relativas de vías individuales y sus productos a la resistencia en plantas. A este respecto el metabolismo secundario se ha estudiado preferencialmente, porque éste genera productos de diversidad estructural, muchos de los cuales muestran propiedades relacionadas a la defensa, tal como la actividad antimicrobiana que presentan las fitoalexinas o compuestos con la capacidad de modificar las características físicas de la pared celular (Somssich y Hahlbrock, 1998). Esta serie de eventos incluyen la muerte celular localizada en los sitios de infección (la respuesta de hipersensibilidad HR) y la resistencia sistemática adquirida en órganos distantes de la planta. Se ha sugerido que la resistencia o susceptibilidad de una planta al patógeno es determinada después del intercambio secuencial de señales entre el patógeno y el hospedero.

La producción de estimuladores (elicitores) y el reconocimiento resultante por la planta son contraproducentes para la patogénesis fungal. Una estrategia para eludir el reconocimiento es la secreción de supresores de la respuesta de defensa (Bushnell y Rowell, 1981). El modelo más común sobre la actividad del estimulador se explica por el

1. INTRODUCCIÓN

enlace del estimulador al receptor localizado en la superficie de la célula vegetal, iniciando la cascada de transducción de señales de la defensa de la planta contra el patógeno. A diferencia de estas moléculas, los supresores pueden interferir directamente con el enlace del estimulador, en la transducción de la señal, la activación génica, o los factores de actividad de defensa de la planta. La evidencia de la existencia de supresores, vino de la observación de que la infección de algunas plantas por razas virulentas fungales frecuentemente las hacía más susceptibles a razas de hongos que normalmente son avirulentos para ellas. Los supresores sólo han sido descritos para pocas especies de hongos fitopatogénicos, uno de ellos es *Mycosphaerella pinodes* patógeno de chícharo (Shiraishi *et al.* 1991b).

1.1.2.2 Enzimas hidrolíticas.

Para colonizar la planta, los hongos han desarrollado estrategias para invadir tejidos vegetales, optimizar el crecimiento en la planta, y propagarse. Bacterias y virus, así como algunos parásitos oportunistas fungales, dependen de las aperturas naturales o heridas del hospedero para su invasión. En contraste, muchos hongos patogénicos han desarrollado mecanismos para atravesar activamente las barreras exteriores de las plantas: la cutícula y la pared celular epidermal. Para lograr la entrada, el hongo generalmente secreta un cóctel de hidrolasas, incluyendo cutinasas, celulasas, pectinasas y proteasas. Alternativamente o en combinación con enzimas hidrolíticas, algunos hongos forman órganos de penetración parecidos a clavijas en la punta de sus tubos germinales. La clavija de infección se desarrolla y penetra a través de la cutícula y la pared celular, posiblemente auxiliada por enzimas hidrolíticas.

1.1.2.3 Toxinas.

Las toxinas pueden ser definidas como productos microbiales que pueden estar dañando directamente las células de la planta, los cuales están involucradas en el desarrollo de la enfermedad. Las toxinas fungales son un grupo diverso de metabolitos secundarios de bajo peso molecular.

Después de la penetración, la siguiente etapa en la estrategia fungal para colonizar una planta es la producción de toxinas o compuestos semejantes a fitohormonas que manipula la fisiología de la planta para el beneficio del patógeno. La interferencia puede consistir en simplemente matar las células de la planta con el propósito de tomar nutrientes o una dirección más sutil de la maquinaria celular (Keen, 1986), y esto se logra por la producción de fitotoxinas con grado variable de especificidad hacia distintas plantas. Algunas toxinas son selectivas de la planta hospedera, mientras que otras son activas en un gran rango de especies de plantas. Las fitotoxinas se han sido identificado en un gran espectro de patógenos, pero su actual papel en la patogénesis ha quedado poco claro en la mayoría de los casos. Sin embargo, en algunas interacciones planta-hongo, estudios bioquímicos y genéticos determinaron que las toxinas eran los determinantes de

1. INTRODUCCIÓN

especificidad. En estos casos, la resistencia o susceptibilidad al hongo siempre correlaciona con la sensibilidad o insensibilidad a la toxina. Consecuentemente, estas toxinas del hongo selectivas para el hospedero, las cuales son producidas principalmente por especies del género *Alternaria* y *Cochliobolus*, han atraído mucha atención. En contraste, las toxinas no selectivas del hospedero son activas sobre especies hospederas y no hospederas. Aunque el modo de acción de sólo una pequeña porción de estas toxinas se han dilucidado, dos ejemplos ilustran la función potencial de las toxinas no-selectivas.

Varias toxinas fungales se dirigen a la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. Esta ATPasa es activada por la fusicocina, una toxina no-selectiva del hospedero, y principal metabolito de *Fusicoccum amygdali*, patógeno del melocotón y la almendra, que es generalmente activo en plantas superiores. El incremento resultante de la toma de K^+ (y otros cationes), Cl^- , y agua por las células guarda estomatales, causa la apertura irreversible de los estomas y el marchitamiento de las hojas, los cuales son síntomas típicos de la enfermedad. Un segundo proceso fundamental de la planta, la transferencia de energía durante la fosforilación dirigida por luz en cloroplastos, es inhibida por una toxina diferente no selectiva del hospedero, tentoxina. En plantas sensibles, este tetrapéptido cíclico, el cual es producido por el patógeno de *Alternaria alternata* y con un extenso rango de hospederos, causa la clorosis de los retoños y la detención del crecimiento de la planta. A pesar de la identificación de un objetivo específico para las acciones de la tentoxina y la fusicocina, no se ha demostrado inequívocamente que la sensibilidad de las especies de plantas a estas toxinas es el único factor responsable para la susceptibilidad al patógeno. La contribución de las toxinas no selectivas del hospedero a la patogenicidad del hongo que las produce, aún queda por ser definida (Knogge, 1996).

1.1.2.3.1 La fumonisina B₁

La fumonisina B₁ (FB₁) es una toxina que se encuentra estructuralmente relacionada con la actividad promotora de cáncer en humanos y la cual es producida principalmente por el hongo *Fusarium moniliforme*. Se han encontrado grandes concentraciones de esta toxina en muestras de maíz en áreas con gran proporción de cáncer de esófago (Thiel *et al.* 1991). El hongo *Fusarium moniliforme* es uno de los hongos más asociados con maíz y otros granos destinados al consumo animal y humano. *F. moniliforme* puede encontrarse en el interior de la cubierta de la semilla de maíz aparentemente saludable, sin embargo, puede causarle podredumbre durante esta etapa o en la germinación. En la mazorca causa podredumbre de color rosa, observándose la contaminación en los granos por esta coloración (Neergaard, 1977). También es causa de ataques de leucoencefalomalacia (LEM) en equinos, la cual es una enfermedad neurotóxica de caballos y asnos producida por la ingestión de maíz infectado por *F. moniliforme*. Es extremadamente tóxico a animales en experimentación y es hepatocarcinogénico en ratas (Marasas, 1985), además de inducir síndrome de edema pulmonar en cerdos (PES). Hasta hace poco tiempo (1985), la toxicidad de este hongo no podía ser atribuida a alguna de las micotoxinas conocidas de *Fusarium* (fumonisinas, ácido fusárico, giberelinas, en ciertas líneas fusariocinas A y C, fusarina C y moliniformina y zearalenona que se encuentran en muy baja proporción). Por

1. INTRODUCCIÓN

tanto, la estructura química de la micotoxina que causaba la leucoencefalomalacia equina y el cáncer de hígado en ratas era desconocida.

Ya para 1988 se habían aislado y caracterizado las estructuras de la fumonisina B₁ (FB₁) y fumonisina B₂ (FB₂). Pero para 1990 se había confirmado que FB₁ era causante de LEM en equinos y de PES en cerdos. Además, se demostró que en ratas en experimentación se producía cáncer hepático al darles alimento contaminado con FB₁ (Marasas, 1996). Las fumonisinas pueden ser encontradas en el grano entero del maíz a niveles de 1.0 µg/g o más bajos. Se ha propuesto que los niveles de fumonisina para causar una enfermedad animal son de 5 a 10 µg/g (Bullerman, 1996). Además es fitotóxico y causa muerte rápida a la hierba hedionda, toloache (*Datura stramonium*), en una concentración de 2.5 mg/50 ml y podredumbre ligera en hojas cortadas y expuestas a FB₁ en una concentración de 2.5 µg/100 µl durante un período de 24 horas. FB₁ es similar estructuralmente a la toxina TA, la cual es producida por *Alternaria alternata lycopersici* y produce síntomas necróticos genotipo-específico que son idénticos a los producidos por esta toxina sobre hojas de líneas de tomate resistentes y susceptibles. También se ha reportado que FB₁ es fitotóxica a la lenteja de agua (*Lemna minor*) y reduce el crecimiento así como la capacidad para sintetizar clorofila en 0.7 µg/ml; a esta concentración la toxina TA inhibe también la síntesis de clorofila, pero no reduce el crecimiento a la misma extensión que FB₁. FB₁ y TA causan reducciones en el crecimiento de retoños de maíz que son dependientes de las dosis y son más fitotóxicas que FB₂ y FB₃, y que sus análogos FA (FA₁ y FA₂), y que sus productos de hidrólisis AP₁ y AP₂. En experimentos de virulencia sobre plántulas de maíz con cepas de *Fusarium moniliforme* productoras (*fum1*⁺) y no productoras (*fum1*⁻) de FB₁ se demostró que las cepas de *Fusarium* que producía FB₁ presentaban mayor virulencia que las cepas que no producían FB₁ y esto se observó ya que los síntomas de marchitamiento sobre las plántulas y reducción de la longitud de la radícula eran más severos cuando la cepa de *Fusarium* era productora de FB₁. Al probar el efecto de la FB₁ aislada sobre las plántulas de maíz se observaron los mismos síntomas de enfermedad que con el hongo que produce la toxina pero a una extensión menor. Estos resultados propusieron que la FB₁ es un factor de virulencia de este patógeno ya que la FB₁ desempeña un papel en la virulencia al afectar la extensión del daño causado por la enfermedad pero su producción no es necesaria o suficiente para que el hongo pueda causar enfermedad en plantas. (Desjardins *et al.* 1995)

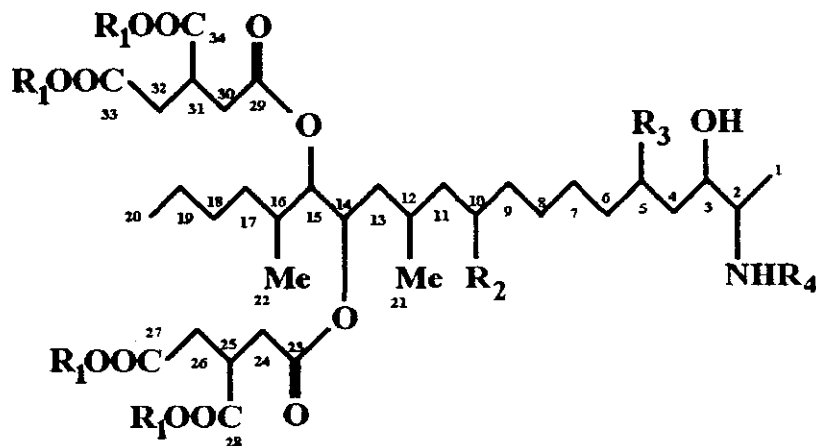
1.1.2.3.1.1 Estructura.

Se han caracterizado las estructuras de la fumonisina B₁ (la fumonisina más abundante de las naturales), las fumonisinas B₂, B₃ y B₄ y sus productos de hidrólisis (de las series HB), así como de las series A y C (ver figura 1).

La fumonisina B₁ es una molécula anfipática, sin embargo su parte hidrofílica, al igual que en las otras fumonisinas, hace que no sea soluble en disolventes orgánicos. La gran similitud en la estructura de las fumonisinas hace difícil separarlas una de otra. Los pesos moleculares de FB₁ y FB₂ sólo difieren en 16 unidades de masa y FB₂ y FB₃ son

1. INTRODUCCIÓN

isómeros. En estudios de resonancia magnética nuclear se ha observado que la FB₁ en disolventes polares se encuentra como zwitterion y tiene interacciones fuertes con cationes metálicos (Blackwell *et al.* 1996), además de que los desplazamientos químicos de la molécula dependen fuertemente del pH.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Fumonistina B₁	H	OH	OH	H
Tetrametil FB₁		CH ₃	OH	OH H
Fumonistina B₂	H	H	OH	H
Fumonistina B₃	H	OH	H	H
Fumonistina A₁		H	OH	OH COCH ₃
Fumonistina C₁		H	C-1, H reemplaza CH ₃	
FB₁ hidrolizada	C-14, C-15 son OH.			

Fig. 1. Estructura de algunas fumonisinas (Blackwell *et al.* 1996)

Un examen de la estructura de FB₁ (Fig. 1) muestra que la molécula contiene 10 estereocentros, lo cual da un total de 1024 posibles estructuras estereoquímicas diferentes, por estudios de NMR se ha llegado a la conclusión de que sólo una se encuentra en solución (Blackwell *et al.* 1996). Según la nomenclatura de la IUPAC, la FB₁ es 1,1'-[1-(12-amino-4,9,11-trihidroxi-2-metiltridecil)-2-(1-metilpentil)-1,2-etanedil] éster, [2S-[1[1R*(S*), 2S*(S*), 2(S*)],-2R*,4S*,9S*,11R*,12R*]]- 1,2,3- ácido propanetricarboxílico.

1. INTRODUCCIÓN

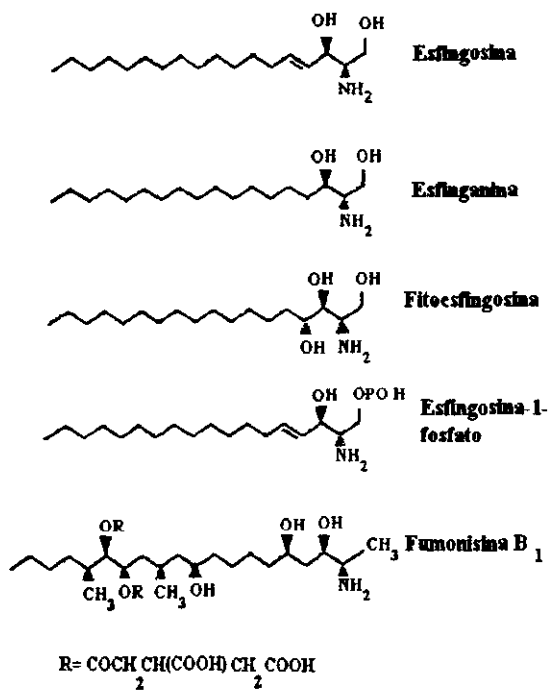


Fig. 2. Estructura de bases esfingoideas y la fumonisina B₁.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.2.3.1.2 Mecanismo.

Se ha demostrado que varias de las fumonisinas (FB₁, FB₂ y HB₁) son inhibidores potentes de la biosíntesis de esfingolípidos y que actúan específicamente sobre la actividad de la ceramida sintasa. Aunque se desconocía el mecanismo de acción de las fumonisinas, se observó que estos compuestos tienen similitud estructural con la esfingosina, la cual es una base esfingoidea de cadena larga, que constituye el esqueleto covalente de la esfingomielina, cerebrosidos y otros esfingolípidos. Se ha reportado que en hepatocitos, la fumonisina B₁ inhibe la biosíntesis de *nov*o de esfingolípidos por la inhibición de la conversión de esfinganina a dihidroceramidas, lo cual precede a la introducción del doble enlace 4,5-*trans* de la esfingosina. De acuerdo con estas observaciones, la fumonisina B₁ inhibió la actividad de esfingosina N-aciltransferasa en microsomas de hígado de rata (Wang *et al.* 1991) e inhibió la ceramida sintasa en microsomas de cerebro de ratón (Merrill *et al.* 1993). En plantas como tomate se ha observado que la fumonisina B₁ produce la acumulación de bases esfingoideas como la fitoesfingosina y esfinganina que se encuentran comúnmente en bajas concentraciones, lo cual sugiere que la lesión bioquímica primaria es la inhibición de *nov*o de ceramida y por tanto de esfingolípidos.

Estudios recientes han mostrado que estas bases de esfingolípidos son inhibidores potentes de proteínas cinasas C y de ATPasas de Na⁺ y Cu²⁺ en animales. Por lo que se ha propuesto que la célula utiliza los productos de hidrólisis de esfingolípidos para regular el comportamiento celular, de manera similar a los segundos mensajeros lipídicos (diacilglicerol, ac. araquidónico y sus metabolitos), que son derivados de fosfoglicéridos. Además, el aumento de los niveles de estas bases se les ha vinculado directamente con diversas enfermedades con síntomas de neurotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrototoxicidad, inmunotoxicidad y carcinogénesis.

También se ha reportado que la FB₁ es inhibidor de fosfatasa de proteínas (PPs), las cuales se encuentran involucradas en el control de actividades biológicas. Se ha propuesto que el tipo de inhibición que produce esta toxina es muy parecida a la que produce el ácido okadaico (OA), el cual es un inhibidor conocido de PPs (aunque debe notarse que OA inhibe a concentraciones de 0.04 a 5000 nM mientras que FB₁ de 80 a 3000 μM). Esto podría sugerir que la FB₁ podría alterar vías de transducción de señales donde podrían estar participando estas PPs (Fukuda *et al.* 1996).

1.1.3 Inducción de la producción de metabolitos por la planta

1.1.3.1 Fitoalexinas.

Durante la infección, las plantas producen metabolitos secundarios, los cuales normalmente están ausentes o en pequeñas cantidades en plantas sanas. Muchos de ellos tienen propiedades antibióticas, a éstos se les llama fitoalexinas. Su producción es una reacción de defensa. Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, que son sintetizadas en células moribundas alrededor del sitio de la infección.

1. INTRODUCCIÓN

Cuando se cuantifican los niveles de fitoalexinas en secciones muy cercanas al sitio de la infección se encuentran niveles de estos compuestos suficientemente altos como para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias, así como para matar las células de la planta. En células de sorgo que son enfrentadas con *Colletotrichum graminicola*, se acumulan fitoalexinas pigmentadas en vesículas intracelulares. Cuando estas vesículas se fusionan y revientan, se liberan grandes concentraciones de fitoalexinas, matando tanto a las células de plantas como a las células del hongo invasor (Walton, 1997).

Se han caracterizado cientos de fitoalexinas. Estas se presentan especialmente en Fabaceas (Leguminosas) y Solanaceas, pero también se encuentran en otras 15 familias. Las fitoalexinas no son cosmopolitas. Éstas se presentan en avena, sorgo y arroz, pero aparentemente no en maíz. Las fitoalexinas son químicamente diversas, pero un gran número de éstas son productos de la vía de los fenilpropanoides. Las fitoalexinas flavonoides incluyen a la kievitona y la faseolina de frijol (habichuela), la pisatina en chícharo y la gliceolina de frijol soya. El gossipol de algodón, el casbeno de grano de ricino, y el rishitin de plantas solanaceas son ejemplos de fitoalexinas biosintetizadas a través de la vía del ácido mevalónico (Walton, 1997).

La habilidad de *N. haemtococca* para desmetilar pisatina, es indispensable en la tolerancia a esta fitoalexina y para la patogenicidad hacia chícharo. Aunque la acumulación de estos metabolitos en plantas ayuda a evitar la infección por hongos o bacterias, a ciertos niveles llega a matar a las células de la planta que las produce.

Las fitoalexinas afectan el crecimiento del hongo, inhibiendo la elongación del tubo germinal, crecimiento de la colonia (velocidad de crecimiento radial) y la acumulación de peso seco. El principal efecto de las fitoalexinas sobre el hongo es la perturbación de la membrana de la hifa fungal. La membrana plasmática es perturbada rápidamente y es afectada la integridad estructural, resultando en una pérdida masiva de electrolitos. También hay evidencias de que las fitoalexinas interrumpen las vías metabólicas de respiración. Hay alguna evidencia de que las fitoalexinas inhiben la acción de enzimas que sintetizan pared celular fúngica, pero esto puede ser una perturbación primaria del sistema integrado de síntesis/lisis de crecimiento de pared en la punta de la hifa. Sin embargo, los efectos de las fitoalexinas sirven para restringir el crecimiento del hongo en los tejidos de la planta hospedero aunque su función en la resistencia a la enfermedad es controversial (Isaac, 1992).

1.2 La membrana plasmática en plantas.

La célula vegetal contiene un número de organelos y sistemas membranosos incluyendo los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, Golgi, tonoplasto, retículo endoplásmico, una variedad de vesículas bien definidas y un núcleo, todos embebidos en el citoplasma y encerrados por la membrana plasmática, la cual a su vez está rodeada de la pared celular, misma que confiere estabilidad y protección contra daño mecánico a la célula. Además la membrana plasmática mantiene en el interior de la célula un medio

1. INTRODUCCIÓN

relativamente constante para el metabolismo intracelular, llevando a cabo un intercambio balanceado de metabolitos con el resto del organismo y sus alrededores (Larsson, 1990 y referencias).

Los principales componentes de la membrana plasmática son lípidos, proteínas y carbohidratos. Algunas membranas plasmáticas como las de hojas de espinacas y cebada contienen un 40 y 30% (p/p) de proteína, respectivamente; es incierto cómo se divide el restante 60-70% entre carbohidratos y lípidos. Sin embargo se ha reportado un porcentaje para carbohidratos del 20% en membranas de plantas. La densidad de las vesículas de membrana que se ha determinado por centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa se localiza en la mitad del rango de $1.10-1.24 \text{ g cm}^{-3}$. A partir de datos de la medición del grosor de la membrana plasmática de frijol soya, espinaca, cebolla, entre otros, por microscopía electrónica se obtuvo que su valor es de 9 a 11 nm (Larsson, 1990).

En las membranas biológicas existen cargas positivas y negativas debido a las proteínas, lípidos y carbohidratos. Datos electroforéticos muestran que la mayoría de las membranas, si no es que todas, poseen una carga neta negativa a pH neutro. El punto isoeléctrico que se ha determinado por este método ha sido de 3.4-4.4. La carga neta negativa en la membrana produce un potencial de superficie negativo. La medida del potencial superficial depende tanto del número de cargas negativas como de la concentración y tipo de cationes en el medio con los que se encuentra en contacto la membrana. Las vesículas de membrana plasmática aisladas de raíces de cebada, trigo y avena tienen asociados Ca^{2+} y Mg^{2+} a su superficie apoplástica exterior en cantidades casi iguales. El papel de estos iones es desconocido, pero hay posibilidades de que puedan estabilizar la membrana plasmática o ser cofactores para enzimas y puedan también modular el potencial de superficie (Larsson, 1990).

1.2.1 Estructura y composición

1.2.1.1 Composición lipídica.

Todas las membranas biológicas están constituidas de una bicapa lipídica, la cual constituye el armazón estructural en el cual las proteínas membranales están ancladas. Debido a la fluidez de la bicapa lipídica, los lípidos y las proteínas pueden moverse con libertad en el plano de la bicapa al menos que su movimiento sea restringido por interacciones con otras moléculas o con el citoesqueleto. La descripción anterior de la membrana plasmática corresponde al modelo del mosaico fluido de las membranas biológicas (Fig. 3).

Las principales clases de lípidos en la membrana tanto de plantas como de animales son los esteroides, glicolípidos y fosfolípidos. La mayoría de los esteroides se encuentran libres, los esteroides que predominan en plantas son: el sitosterol, campesterol y estigmasterol. Otros esteroides poco comunes encontrados en algunas especies son: cicloartenol (avena), espinasterol, estigmastanol y 7-estigmastanol (espinaca). También se

1. INTRODUCCIÓN

encuentran ésteres de estos esteroides, así como glicósidos y glicósidos acilados, los cuales parecen ser más abundantes en plantas que en membranas plasmáticas de mamíferos. La composición de esteroides varía de un órgano a otro de la planta como raíz y hoja (Rochester *et al.* 1987).

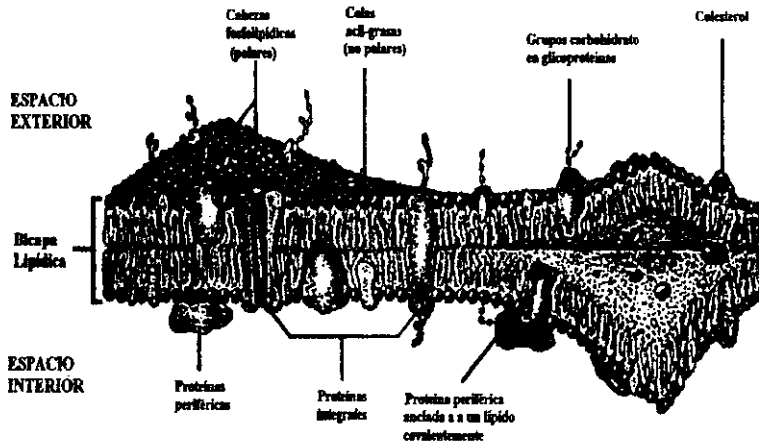


Fig. 3 Modelo actual del mosaico fluido para representar la estructura de la membrana (Lehninger *et al.* 1993)

1. INTRODUCCIÓN

El glucocerebrósido es el principal glicolípido, pero también se encuentran pequeñas cantidades de monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y digalactosildiacilglicerol (DGDG). La fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) son los principales fosfolípidos en membranas de plantas y de animales. En mamíferos la PC se sustituye en algunas ocasiones por esfingomielina (EM), ya que ambos fosfolípidos contienen como grupo cabeza a la colina, sin embargo no es muy probable que esto suceda en plantas ya que aún no se ha detectado la existencia de EM en membranas plasmáticas de células vegetales. En plantas el ácido fosfatídico (PA), le sigue a la PC y la PE en abundancia. El fosfatidilinositol (PI), el cual juega un papel importante en la transducción de señales a través de la vía el ciclo de fosfoinosítidos, está presente en cantidades menores (Rochester *et al.* 1987).

En las membranas plasmáticas de animales se observa asimetría con respecto a la distribución de fosfolípidos en ambas caras de la bicapa, como por ejemplo la PC y la EM en animales se encuentra preferencialmente en la cara exterior de la bicapa mientras que la fosfatidilserina (PS) y la PE se localizan mayormente en la cara citoplásmica. Sería de esperarse que hubiera dicha asimetría en las membranas de plantas aunque no hay aún evidencia al respecto, el bajo punto isoeléctrico de la superficie apoplásmica de estas membranas ($pI = 3.4-4.4$), sugiere que hay una distribución preferencial de fosfolípidos muy ácidos, fosfatidilglicerol (PG) y PA en la cara exterior de la bicapa.

Los principales ácidos grasos en glicerolípidos de membranas plasmáticas son los ácidos palmítico (16:0), linoléico (18:2), y linolénico (18:3), lo cual contrasta con las membranas plasmáticas de mamíferos, donde predominan el ácido palmítico, esteárico (18:0) y araquidónico (20:4). A pesar de estas diferencias, el grado de insaturación de los ácidos grasos en membrana plasmática es similar en membranas plasmáticas de plantas y animales (Larsson, 1990).

1.2.1.2 Composición polipeptídica.

Los polipéptidos membranales pueden ser divididos en dos grupos principales: integrales (intrínsecos) y periféricos (extrínsecos). Los polipéptidos integrales tienen secuencias hidrofóbicas relativamente grandes y se expanden a través de la membrana una o varias veces. Por lo tanto los polipéptidos integrales están firmemente anclados en la membrana y pueden ser liberados sólo por detergentes o tratamientos similares. Los polipéptidos periféricos son hidrofílicos y están enlazados a la superficie de la membrana por fuerzas electrostáticas y se les remueve al lavar las membranas en soluciones con concentraciones altas de sal y pH (Larsson, 1990).

Los polipéptidos integrales son de particular interés, ya que ellos constituyen (o son subunidades de) proteínas que participan en: transporte de solutos, síntesis de pared celular, transducción de señales y transporte electrónico, por lo tanto, están relacionadas con funciones de comunicación a través de la membrana como se muestra en la figura. Muchas membranas biológicas muestran heterogeneidad lateral, es decir, ciertas proteínas y lípidos

1. INTRODUCCIÓN

se encuentran principalmente en áreas o dominios específicos.

Se han identificado sólo unos pocos de los muchos polipéptidos que componen la membrana plasmática de plantas, tales como: la ATPasa de H^+ con un peso molecular de 100kDa, una ATPasa de Ca^{2+} de 140 kDa, un supuesto transportador de sacarosa de 42 kDa y el receptor de fusicocina que contiene dos polipéptidos de 30 y 31 kDa. También se han clonado otra serie de proteínas integrales tales como: el simportador de aminoácidos NAT2/AAP1 (*Arabidopsis*), el cual es un polipéptido de 52.9 kDa (Chang y Bush, 1997) y el transportador de lisina-histidina (LHT1 en *Arabidopsis*), este es una proteína de 50.5 kDa (Chen y Bush, 1997). Además se han clonado y caracterizado transportadores de azúcares como HUP1 y STP1, los cuales son simportadores de glucosa en *Arabidopsis*, así como el transportador de monosacáridos (MST1), el cual fue clonado de *Nicotiana tabacum*; el simportador de monosacárido- H^+ , HUP2, en *Chlorella kessleri* (alga verde). Algunos transportadores de disacáridos como la sacarosa se encontraron en espinaca (SoSUT1) y en papa (StSUT1), en *Arabidopsis* se identificaron AtSUC1 y AtSUC2 o de *Plantago major*, PmSUC1 y PmSUC2 (Sauer *et al.* 1994).

1.3 La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de plantas impulsa el transporte de H^+ mediante la hidrólisis de ATP. Esta enzima tiene un estricto requerimiento de Mg^{2+} y es específica para su sustrato ATP. Diferentes reportes muestran que la K_m para MgATP se encuentra en el rango de 0.3 a 1.4 mM y el pH óptimo en aproximadamente 6.6 (Becker *et al.*, 1993; Brauer *et al.*, 1989). La actividad específica de la enzima en vesículas de membrana plasmática purificada es del orden de 1 a 2 $\mu\text{molP}_i \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína hasta 13 $\mu\text{molP}_i \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína (Palmgren y Christensen, 1993). Algunos inhibidores de la actividad de esta enzima son: el vanadato ($K_i= 1 \mu\text{M}$), la dicitclohexilcarbodiimida ($K_i= 20 \mu\text{M}$) y el dietilestilbestrol ($K_i= 40 \mu\text{M}$). Esta enzima es resistente a la NaN_3 (5mM) y a la oligomicina ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$; ambos inhibidores de la ATPasa mitocondrial), a 0.1 M de KNO_3 (un inhibidor de la ATPasa vacuolar) y a 0.1 mM de molibdato (un inhibidor de fosfatasa no específicas presentes en las preparaciones de membrana plasmática). El ciclo catalítico de esta enzima implica la formación de un intermediario de aspartil-fosfato en un residuo de la enzima. Por eso, esta enzima pertenece a las ATPasas tipo P, a las cuales también se les llama ATPasas E_1E_2 , lo cual se refiere al hecho de que este tipo de ATPasas pasan a través de dos diferentes estados conformacionales durante su catálisis (Michelet y Boutry, 1996).

Esta enzima es estimulada por K^+ *in vitro*, aunque el K^+ actúa como un simple efector y no es transportado por la ATPasa. Sin embargo, por analogía con lo que se ha observado en levadura, se postula que el K^+ se transporta por una asociación estrecha entre la ATPasa y un canal de K^+ (Briskin y Hanson, 1992; Serrano, 1989).

La clonación molecular de los genes de ATPasa de H^+ ha hecho posible deducir su estructura primaria. En *Arabidopsis thaliana* (10), *Nicotiana plumbaginifolia* (9), arroz,

1. INTRODUCCIÓN

maíz, papa y frijol se han aislado varios genes de esta enzima cuyas secuencias corresponden a proteínas de 948 a 957 aminoácidos y con una masa molecular predicha de 104-105 kDa (Michelet y Boutry, 1996).

1.3.1 Estructura y función.

Los estudios de hidropatía de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en plantas han dado diferentes modelos que predicen de ocho a diez segmentos transmembranales. Por analogía a la ATPasa de levadura, se ha propuesto que los extremos amino y carboxilo terminales son citoplásmicos (Michelet y Boutry, 1996). Los cruces transmembranales de la enzima delimitan trechos hidrofílicos, los cuales constituyen aproximadamente un 80% de la proteína. Se ha predicho que sólo el 7% de la proteína está expuesta en la cara exterior de la membrana plasmática y que el resto, una gran región hidrofílica intermedia tiene localización citoplásmica al igual que los extremos amino y carboxilo (Wach *et al.* 1992). Las predicciones de la estructura secundaria son descritas por Michelet *et al.* 1989. Los segmentos transmembranales, de aproximadamente 20 aminoácidos cada uno, podrían formar α -hélices transmembranales. Estos, junto con sus extensiones (de los trechos transmembranales) que rodean del exterior hacia la membrana, pudieran constituir el canal transmembranal. Se han asignado funciones catalíticas a diferentes regiones conservadas de la ATPasa por analogía a otras ATPasas tipo-P. La secuencia de algunos péptidos después de tripsinizar la enzima y varias secuencias nucleotídicas, indican que la ATPasa de membrana plasmática de planta contiene todas las regiones conservadas de las ATPasas eucarióticas (E-P) y que además está estrechamente relacionada a ATPasas de H^+ fungales (Schaller y Susman, 1988).

La región conservada 3 (ver fig. 4), la cual contiene el intermediario fosforilado, estaría localizada en la apertura citoplásmica del canal, en una posición ideal para acoplar el transporte iónico con la hidrólisis de ATP. El acoplamiento implica etapas de fosforilación y desfosforilación. Estudios de mutagénesis dirigida en levadura dan apoyo a la participación de las regiones conservadas 4-7 en el dominio de cinasa, incluyendo la unión de ATP y la formación del intermediario fosforilado y que la región 2 es parte de un dominio de fosfatasa separado, el cual cataliza la hidrólisis del intermediario fosforilado. Las ATPasas (E-P) existen en dos conformaciones, las cuales alternan durante el ciclo catalítico. En la conformación E_1 el dominio de cinasa es activo, pero el de fosfatasa no y el sitio del enlace del protón en la entrada del canal enlaza protones con gran afinidad del lado citoplásmico de la membrana. En la conformación E_2 el dominio de fosfatasa es activo, mientras que el dominio de cinasa no y el sitio del enlace del protón en la entrada del canal une protones con baja afinidad del lado externo de la membrana. Por lo tanto, para que la enzima complete su ciclo catalítico, ésta debe alternarse entre ambas conformaciones para poder realizar el bombeo de protones (Serrano, 1989).

Es probable que fisiológicamente la ATPasa de H^+ en plantas se encuentre en un estado autoinhibido, por ejemplo, estudios *in vitro* sobre la proteólisis controlada de la porción de 7 a 10 kDa del C-terminal de la ATPasa de H^+ resultan en una activación del 70

1. INTRODUCCIÓN

a 590%, el bombeo de H^+ por esta enzima, dependiendo de la especie de planta usada (Palmgren *et al.* 1990, 1991). Este resultado ha sido confirmado por otros reportes. Aunque no se asegura que esta activación se presente *in vivo*, sugiere algunos mecanismos de modulación de esta enzima por otros factores.

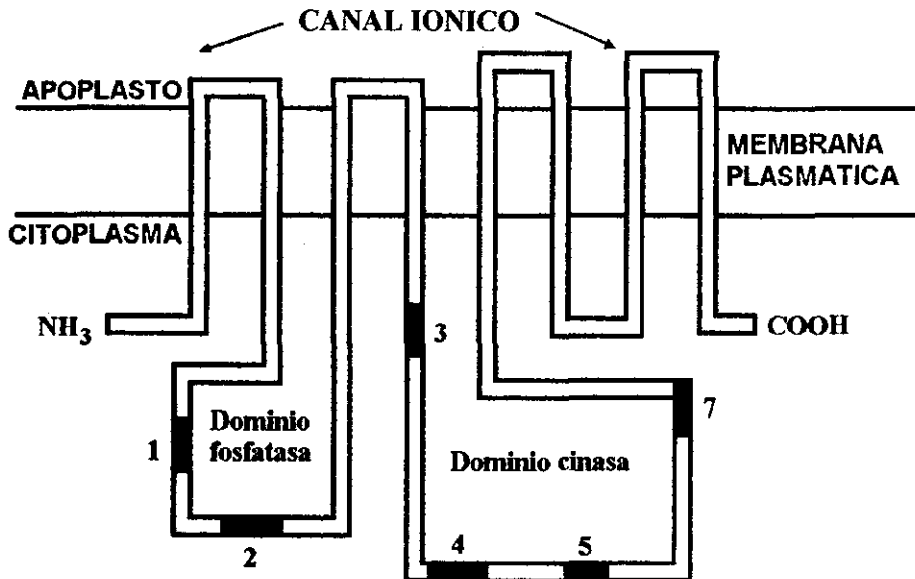


Fig. 4. Modelo propuesto de la estructura de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en la membrana, dominios y regiones conservadas (señaladas en negro). (Serrano, 1989)

1. INTRODUCCIÓN

1.3.2 Funciones fisiológicas.

En plantas la toma de nutrientes minerales del suelo ocurre contra un gradiente de concentración. El papel de la ATPasa es importante ya que energiza sistemas de transporte secundario en la membrana como canales de K^+ , simportes H^+/K^+ , el simporte H^+/NO_3^- , etc, así como otros nutrientes como sacarosa y aminoácidos: simportes de azúcar/ H^+ y aminoácidos/ H^+ . Se ha propuesto otra función importante de la ATPasa cuando se somete a la planta a estrés osmótico. En células vegetales en cultivo sometidas a estrés osmótico se activa el eflujo de H^+ producido por la ATPasa, esto ilustra que esta enzima puede estar permitiendo la toma de K^+ seguida por adaptación osmótica y como la ATPasa puede estar involucrada en varios fenómenos relacionados con turgor tales como el crecimiento celular y de la planta, movimiento de órganos y estomal, y tolerancia a la salinidad. El pH intracelular se regula por la ATPasa de H^+ y por la utilización intracelular de H^+ , especialmente en el metabolismo de malato. Ya que la ATPasa tiene un pH óptimo de 6.6, muy abajo del pH fisiológico de la célula de la planta (7.2-7.5), al acumularse los H^+ en el citoplasma, la actividad de la ATPasa se incrementa, lo que resulta en la expulsión de un exceso de H^+ de la célula. La alcalinización del citoplasma, puede disparar eventos importantes en la respuesta a señales hormonales y del desarrollo. Consecuentemente, la ATPasa puede actuar como un intermediario en ciertas vías de transducción de señales más que simplemente ser un objetivo final (Michelet y Boutry, 1995).

1.3.3 Regulación de la ATPasa de H^+ .

1.3.3.1 Modulación de la actividad de la enzima por: fosfolípidos, auxina, luz, y cinasas.

La capacidad de los fosfolípidos para modular otros tipos de ATPasas tipo P ha sido conocida por algún tiempo. Cuando los efectos de estos compuestos fueron probados sobre la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de plantas, se demostró que activan a la enzima por incrementar su V_{max} sin alterar su K_m para MgATP o el pH óptimo (Palmgren and Sommarin, 1989; Palmgren *et al.* 1990, 1991). Esto muestra que hay gran similitud entre la activación proteolítica (al remover el carboxilo terminal de la enzima) y aquella por fosfolípidos.

Además de la auxina se han propuesto otras fitohormonas como el ácido abscísico y brassinólidos como moduladores de la actividad de la ATPasas de H^+ . Esto es especialmente interesante en el crecimiento celular, ya que la auxina activa la bomba de H^+ resultando en el aflojamiento de pared celular, tanto por la ruptura de enlaces lábiles al ácido o por activar enzimas líticas dentro de la pared celular (Rayle y Cleland, 1992). Se puede tomar en cuenta otro nivel de regulación: postraduccional. Se ha propuesto que la ATPasa de H^+ se transporta a la membrana plasmática por una vía secretora. También se sabe que la auxina mejora el flujo membranar del retículo endoplasmático a la membrana plasmática (Hager *et al.*, 1991). Ya que la auxina también induce un incremento rápido tanto en la cantidad y la actividad de la ATPasa de H^+ en la membrana plasmática, es

1. INTRODUCCIÓN

probable que su transporte sea acelerado en el proceso. Si se considera la velocidad de la respuesta de la auxina observada en el estudio de Hager *et al.* (1991), la regulación traduccional y la degradación proteínica también pueden estar involucradas. De datos de inhibición de síntesis de proteínas por cicloheximida, Hager *et al.* sugirieron que la poza de ATPasa que era insertada en la membrana de *novο* durante el tratamiento con auxina tiene una vida media muy corta de cerca de 12 min. Si esta vida media corta resulta de la desestabilización indirecta por cicloheximida de una isoforma estable de la ATPasa o de la inducción de una isoenzima más inestable por auxina, es desconocido.

Para la inducción del efecto de la luz sobre los estomas se tiene que activar la ATPasa de H^+ en células guardia. El mecanismo de esta modulación es desconocido, pero es interesante que la activación de la ATPasa de H^+ es paralela a la modificación inducida por la luz en el fosfoinosítido de la membrana plasmática y por la activación de una cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina. En avena la ATPasa de H^+ es fosforilada por una cinasa estimulada por Ca^{2+} asociada con la membrana plasmática. Ya que los niveles de calcio intracelular durante eventos de transducción de señales se encuentran en las concentraciones que este tipo de cinasa requiere (1 a 7 μM), se ha sugerido que esta enzima puede estar modulando la actividad de la ATPasa. Esto puede ser importante, ya que se ha identificado un sitio de fosforilación en el carboxilo terminal (12 kDa) de la ATPasa de H^+ del alga *Dunaliella acidophila*. Se ha mostrado que un estimulador fúngico de naturaleza peptídica induce la desfosforilación de la ATPasa resultando en la activación de la enzima (Vera-Estrella *et al.* 1994).

1.3.3.2 Modulación de la actividad de la ATPasa por toxinas bacterianas y de hongos.

Las toxinas comunmente causan un incremento en la pérdida de iones celulares y/o agua y es difícil afirmar si esto refleja una acción primaria sobre la membrana plasmática o si esto es sólo un efecto secundario debido a decaimiento celular o a la respuesta de hipersensibilidad (HR). Esto sugiere que algunas toxinas pueden tener influencia sobre la ATPasa de la membrana plasmática.

Varias micotoxinas tienen como blanco a la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, la mejor estudiada de todas es la fusicocina cuyo efecto es activar a la enzima. La fusicocina (FC) es una toxina no-selectiva del hospedero, y es el principal metabolito de *Fusicoccum amygdali*, patógeno del melocotón y la almendra (Rasi-Caldogno y Pugliarello, 1985). El incremento que resulta de la acción de esta toxina en la toma de K^+ (y otros cationes), Cl^- , y agua por las células guarda estomatales, causa la apertura irreversible de los estomas y el marchitamiento de las hojas, típico de la enfermedad. Esta toxina activa a la ATPasa de H^+ de muchas plantas y aún en el alga *Dunaliella acidophila*, FC incrementa la V_{max} de la enzima, si bien hay reportes en conflicto en cuanto a si esta toxina decrece la K_m para MgATP. El efecto de la FC se manifiesta sólo en valores de pH fisiológicos de la planta (7-7.5) y por tanto no en el óptimo de la ATPasa. La activación sostenida de la ATPasa de H^+ por FC se explica por un cambio del pH óptimo hacia valores más alcalinos, haciendo capaz a la ATPasa de mantenerse trabajando a su máxima

1. INTRODUCCIÓN

actividad a un pH citoplásmico alcalino (Rasi-Caldogno *et al.* 1993).

El mecanismo de modulación es indirecto, ya que la molécula a la cual se une FC no es la ATPasa misma. Parece que la modulación de la ATPasa por FC involucra al C-terminal autoinhibitorio de la enzima, ya que el efecto estimulador de la FC y la proteólisis no son aditivos. El receptor de FC ha sido purificado e identificado como perteneciente a la familia de proteínas reguladoras 14-3-3. Los miembros de la familia de proteínas 14-3-3 sirven para una multitud de distintas funciones, a través de regular el estado de fosforilación de las proteínas. Aunque para fusicocina no se ha demostrado que la vía de señalización que conduce a la estimulación de la ATPasa sea a través de la modulación de la actividad de proteínas cinasas/fosfatasa (De Michaelis *et al.* 1996).

En el caso de la toxina Beticolina-1 producida por el hongo *Cercospora beticola*, ésta inhibe la actividad de la ATPasa solubilizada o reconstituida en liposomas, por lo que se ha sugerido que la ATPasa es un objetivo directo de la Beticolina-1 (Gòmes *et al.* 1996).

Los péptidos NIP1 y NIP3 producidos por *Rhynchosporium secalis* también estimulan la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H⁺, esto se refleja en la pérdida de rigidez de las células epidérmicas y en daño en la pared celular (Wevelsiep *et al.* 1993). También ciertos estimuladores de *Cladosporium fulvum* productos de genes *avr* (avirulencia) inducen la desfosforilación transitoria de la ATPasa de H⁺ y posteriormente una refosforilación en la cual están involucradas dos cinasas, la primera tipo PKC (proteína cinasa C) y la segunda es dependiente de Ca²⁺/Calmodulina. Este mecanismo de fosforilación/desfosforilación es utilizado por la planta para regular la actividad de la ATPasa de H⁺ para hacer frente al ataque del patógeno (Xing *et al.* 1996).

También varios patógenos bacterianos de plantas producen toxinas que afectan la actividad de la ATPasa de H⁺, como la siringomicina, producida por *Pseudomonas syringae* (Bidway *et al.* 1987). Esta toxina estimula la actividad de la ATPasa de H⁺, sin embargo el mecanismo por el cual produce el aumento en la actividad es aún desconocido, pero se ha observado que esta toxina induce *in vitro* la fosforilación de la ATPasa. Esto también sugiere que el efecto de siringomicina está mediado por proteínas cinasas asociadas con la enzima (Susuki *et al.* 1992).

Es interesante que estudios *in vitro* demostraron que la suprescina B (supresor de la respuesta de defensa de la planta) inhiba la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de chícharo en una manera no competitiva (Kato *et al.* 1993). Este metabolito es producido por el patógeno *Mycosphaerella pinodes*. Sin embargo, inhibe a la enzima en membranas aisladas de cuatro especies no hospedadas. Por estudios citoquímicos en combinación con microscopía electrónica se reveló que la ATPasa era inhibida sólo en la planta de chícharo (Shiraishi *et al.* 1991a). Estos datos indican que los supresores no sólo actúan para inhibir el enlace del estimulador al receptor en membranas sino también afectando la vía de señalización que conduce a la activación de los genes de la respuesta de defensa.

1. INTRODUCCIÓN

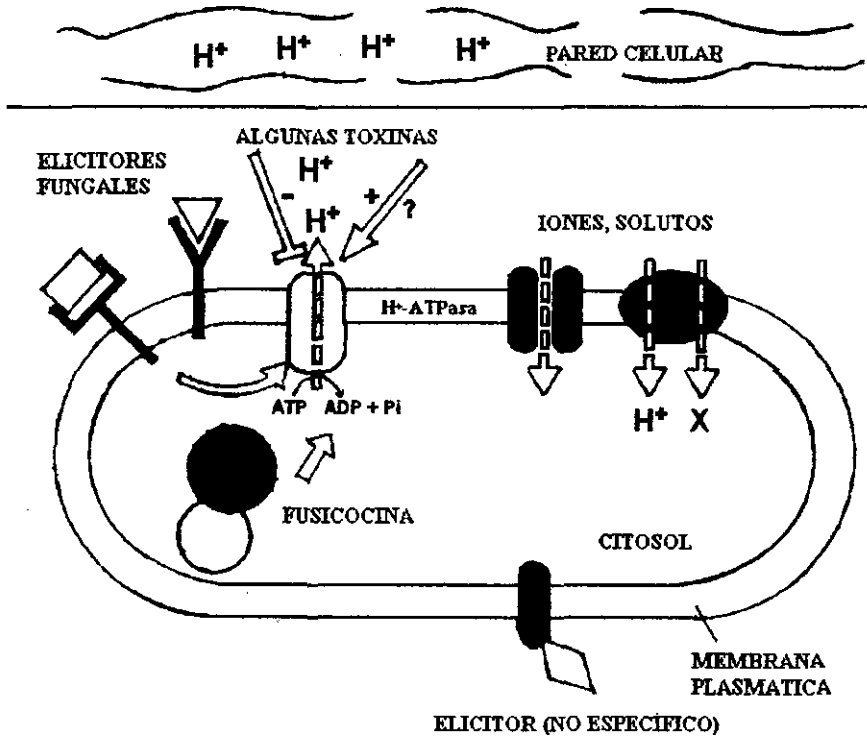


Fig. 5. Efectos de toxinas microbianas y elicitors fungales sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

1. INTRODUCCIÓN

1.3.3.3. Regulación de la expresión génica.

Las plantas poseen un gran número de genes que codifican para la ATPasa de H^+ , por lo que se ha propuesto que varios de estos genes e isoenzimas pueden estar expresándose o funcionando en tipos celulares específicos o bajo ciertas condiciones ambientales. La ATPasa es una de las proteínas membranales más abundantes, aunque en promedio esta enzima representa el 1% de la proteína membranal total, en algunos tipos celulares el porcentaje es mayor, como en el caso del cap de la raíz, epidermis, y el cilindro central (Larsson, 1990). En otros estudios también se ha encontrado en los vellos radiculares y en las células acompañantes del tejido vascular de la planta, siendo el orden de reactividad a anti-ATPasa en forma decreciente: células acompañantes, periciclo, parenquima y endodermis (Parets-Soler *et al.*, 1990).

En estudios con la técnica del gen reportero, por medio de fusionar el promotor transcripcional del gen de interés en un gen reportero exógeno, el cual codifica una enzima cuya actividad se puede medir fácilmente, se ha monitoreado la expresión de los genes de la ATPasa. Se ha demostrado que el gen de *Arabidopsis thaliana aha3* se expresa específicamente en el floema de todos los órganos analizados, también se encontró la expresión en polen y óvulos. Otra isoforma en *Arabidopsis aha10*, se encontró en semilla en desarrollo. Un estudio similar en *N. plumbaginifolia* de seis genes de la ATPasa señala nuevamente a su especialización diferencial y a la regulación de ellos por factores ambientales (Michelet y Boutry, 1996). También se ha propuesto otro nivel de regulación de la expresión génica de esta enzima, ya que varios mRNAs de ATPasa presentan una región 5' no traducida muy larga (más de 250 nucleótidos), la cual contiene un pequeño marco de lectura abierto (3 a 9 residuos). Estas son características típicas de regulación traduccional. El significado fisiológico de estas observaciones y los modos de regulación posibles aún no han sido descritos (Michelet y Boutry, 1995).

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Dada la naturaleza anfipática de la fumonisina B₁, es posible que ésta interactúe con la membrana, siendo factible que la fumonisina B₁ modifique las propiedades de algunos componentes membranales.

Ya que uno de los componentes membranales más importantes es la ATPasa de membrana plasmática, es posible que la FB₁ interactúe con esta enzima.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Se estudiará el efecto de la fumonisina B₁ en los siguientes parámetros para dilucidar su posible mecanismo de acción sobre la ATPasa de H⁺ en embriones maíz:

1. En la germinación de embriones de maíz.
2. En la permeabilidad membranal de embriones de maíz enteros.
3. En la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en embriones enteros y vesículas de membrana plasmática aisladas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron embriones de semillas de maíz del híbrido H-355 (PRONASE, 1993). Los embriones se disecaron manualmente con navaja de un sólo filo. Se realizaron las incisiones en la semilla para la separación del embrión del endospermo, procurando dejar intactos el escutelo y el eje embrionario.

4.2 IMBIBICIÓN DE EMBRIONES.

El material utilizado como pipetas, cajas petri (junto con discos de papel filtro del diámetro de la caja), matraces, etc., se esterilizó a 120 °C en horno o autoclave. También se esterilizó el agua para embeber los embriones en autoclave a 120°C por 20 minutos.

Los embriones se desinfectaron de la siguiente manera:

- Se lavaron añadiendo a los embriones una dilución en agua 1:37 de una solución de hipoclorito de sodio comercial con un contenido de 6% de cloro activo y se agitaron por dos minutos. Se decantó la solución de lavado y posteriormente se enjuagaron los embriones con agua bidestilada, agitando dos minutos (tres veces).

- Los embriones desinfectados se transfirieron a cajas de petri a las cuales se añadió una dilución 1:2 con agua desionizada estéril de una solución stock , la cual también fue esterilizada previamente y que contenía los siguientes compuestos: KCl 50 mM, MgCl₂ 10mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.6, sacarosa 2% y cloramfenicol 10 µg/ml. En los casos en que la imbibición de los embriones se llevó a cabo con fumonisina B₁, se adicionó el volumen necesario de una solución acuosa stock de 1mM de esta toxina para una concentración final en el medio de imbibición de los embriones de 10 ó 20 µM según sea el caso. La siembra de embriones se realizó en área estéril proporcionada por la flama de un mechero Fisher en condiciones asépticas para evitar la contaminación con hongos o bacterias, especialmente porque algunas incubaciones fueron muy largas.

Las cajas de petri se introdujeron a una estufa con temperatura constante de 29°C para su incubación (en la obscuridad) por los tiempos que se indican más adelante.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Al final de la siembra e imbibición de los embriones, todo el material que estuvo en contacto con la FB_1 se desinfectó por inmersión con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 3% por 24 horas o más tiempo.

4.3 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN.

Se seleccionaron 60 embriones de maíz en lotes de 20 embriones por caja, los cuales se distribuyeron en 3 cajas petri. Se pusieron a germinar bajo las condiciones descritas en la sección anterior.

El conteo de los embriones germinados se realizó a los distintos tiempos de incubación (4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72 y 100 horas). Se consideró germinado un embrión cuando la radícula se asomó 2 mm por lo menos de la estructura respectiva.

4.4 MEDICIÓN DEL ESCAPE DE SOLUTOS DE EMBRIONES DE MAÍZ ENTEROS.

Para medir el escape de solutos de los embriones de maíz se determinó la conductancia eléctrica de una solución que contenía a los embriones de maíz. Para esto se realizaron los siguientes pasos:

- 1.- Se calibra el conductímetro (conductímetro portátil rango de 0-1999 μS CONMET1 HANNA instruments). La calibración se realiza con una solución estándar de KCl 0.01 N.
- 2.- Se embeben los embriones según se describe en la sección 4.2, ya sea en presencia o en ausencia de FB_1 por 24 horas.
- 3.- Se enjuaga el exceso de sales del medio de imbibición en los embriones con agua desionizada. El enjuague debe ser muy rápido para evitar la fuga de electrolitos antes de que pueda ser medida.
4. Se toma la temperatura del agua desionizada.
5. Se vierten los embriones en el agua desionizada (35 ml.) del tubo en el cual se encuentra el electrodo del conductímetro sumergido y en funcionamiento, y se va midiendo la conductancia eléctrica cada 0.5 min. después cada minuto, 5 minutos y por último cada 10 minutos hasta las 1.5 horas.
6. Cuando se termina la medición de conductancia en los períodos señalados anteriormente, se retira el electrodo del conductímetro y se coloca el tubo con el

4. MATERIALES Y MÉTODOS

agua y los embriones en agua en ebullición por unos 10 minutos.

7. Después de esto se deja enfriar el tubo y se toma la temperatura hasta que llegue a la temperatura a la cual se realizaron las mediciones del experimento y se toma la lectura de la conductancia eléctrica. Esta última lectura es la que se toma como la de los electrolitos totales.

4.5 OBTENCIÓN DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA.

La obtención de vesículas de membrana plasmática se realizó después de la imbibición de 5-10 g de embriones en ausencia o presencia de FB₁ por 24 horas como se describe en la sección 4.2.

Procedimiento de homogenización. Se realizó de acuerdo a lo descrito por Sanchez-Nieto *et al.* (1997). Se congelaron los embriones con nitrógeno líquido y se homogenizaron con mortero y pistilo preenfriados (15 min.) hasta obtener un polvo fino. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. Se transfirió este polvo fino a un recipiente pequeño y se le añadió medio I en una relación de 1g de embrión por 2 ml. de medio (El medio I se compone de sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM, ATP 1mM, Tris-HCl 70 mM pH 8.0, DTE o DTT* 4 mM, β-mercaptoetanol*15 mM, TPCK* 100 µg/ml, TLCK* 50 µg/ml y quimostatina* 7µg/ml). En seguida se realizó una segunda homogenización con el triturador de tejidos por 2 min a 12 000 rpm. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y el residuo se re-homogenizó con la misma relación de volumen de tejido:medio. Por último, se combinaron ambos filtrados para posteriormente obtener la fracción membranal. El homogenado se centrifugó a una velocidad de 5000 g por 10 min.

El sobrenadante de ésta centrifugación fue denominado fracción de homogenado sin núcleos (H-N). Posteriormente a esta fracción de H-N se le midió cantidad de proteína por el método de Lowry descrito anteriormente.

Para la obtención de vesículas enriquecidas en membrana plasmática se siguió el procedimiento descrito por Larsson *et al.* (1994), buscándose las mejores condiciones para obtener el mayor enriquecimiento en vesículas de membrana plasmática (VMP) de embriones de maíz. El procedimiento es como sigue:

El volumen de fracción de H-N correspondiente a 50 mg de proteína se añadió a una mezcla de fases (que se preparó poco antes de usarse o un día anterior), pesando en la balanza los siguientes componentes:

4. MATERIALES Y MÉTODOS

MEZCLA DE FASES.

Conc. Stock	Cantidad	Conc. final
Dextran T-500 20% (p/p)	11.52 g	6.4%
Polietilenglicol 3350 40% (p/p)	5.76 g	6.4%
Sacarosa sólida	3.05 g	330 mM
0.2 KH ₂ PO ₄ pH 7.8	0.675 ml.	5 mM
Agua	aforar a 27g	

Después de agregar la fracción de H-N, se ajustó a una concentración de KH₂PO₄ 5 mM pH 7.8, 330 mM de sacarosa y a un peso de 9 g.

La fracción de H-N más la mezcla de fases se agitó invirtiendo 25 veces el tubo para centrifugarse después a 1500 g por 5 minutos a 4°C. De ésta centrifugación se lograron separar dos fases: La superior (PEG) a la que se le denominó U₁ (constituída preferencialmente por las vesículas de membrana plasmática) y la fase inferior (Dextran), L₁ (constituída por otras vesículas celulares).

Por último, la fracción de U₁ enriquecida en vesículas de membrana plasmática se diluyó 1:1 en sacarosa 250 mM y Tris/HCl pH 7.5 10 mM y se centrifugó a 100,000 g por 3.5 hs. a 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en 200-500µl de medio II (éste tiene la misma composición que el medio I pero no contiene β-mercaptoetanol), almacenándose en alícuotas de 50-100 µl, a -70°C. Esta fracción es la que se utilizó para medir la actividad de hidrólisis de ATP.

4.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE ATP.

Para realizar este ensayo se utilizó un volumen final de medio de hidrólisis de 150 µl. Este medio contiene sacarosa 250 mM, Tris/HCl 20mM (pH 7.0), CCCP 7µM, ATP/Tris 10 mM (pH 7.0), MgCl₂ 10 mM. Además, lisofosfatidilcolina 100 µM para los casos en que se indica. También se utilizaron inhibidores específicos para algunas enzimas presentes en la fracción obtenida de vesículas de membrana plasmática. NaN₃ 1 mM se usó para inhibir a la ATPasa de H⁺ mitocondrial y Na₃VO₄ 200 µM para la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Para la medición de la actividad de ATPasa en presencia de FB₁ se agregó esta toxina en las siguientes concentraciones según se señale en el experimento 5, 10, 20, 50, 60 µM.

* Éstos se añadieron justo antes de usarse la solución.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La reacción se inició con la adición de 5-10 μg de proteína, dejándose proceder por 1, 2 o 3 hs a 30°C ; la reacción se detuvo con la adición de 150 μl de SDS 24% (99.9% de pureza). La hidrólisis de ATP se midió con la liberación de fosfatos y los resultados se expresaron en $\text{nmolPi mg}^{-1} \text{h}^{-1}$. La cuantificación del fosfato liberado se llevó a cabo por el método de González-Romo *et al.* (1992) descrito en la sección 4.7.

Al final de los experimentos todo el material que estuvo en contacto con FB_1 se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 1 día aproximadamente.

4.7 DETERMINACIÓN DE FOSFATO INORGÁNICO.

Para la determinación de fosfato inorgánico se utilizó el método de González-Romo *et al.* (1992). Para realizar el ensayo de determinación de fosfato inorgánico todas las soluciones, así como el material de vidrio que se utilice, deben estar contenidas en recipientes libres de fosfato inorgánico. Esto se logra lavando el material de vidrio con un detergente libre de fosfatos (Extran) y luego sumergiéndolo en ácido sulfúrico concentrado. En este procedimiento se añadieron 150 μl de la muestra con fosfatos o la solución estándar de fosfato de 1 mM de K_2HPO_4 y se aforó con agua bidestilada a 150 μl , se le añaden 150 μl de SDS al 24% y 300 μl de mezcla B-C (molibdato de amonio al 2% y ácido ascórbico al 12%, disueltos por separado en HCl 1 N y mezclados en relación 1:1). La mezcla se incubó de 3-10 min a temperatura ambiente y se agregaron después 450 μl del reactivo E (citrato de sodio 2%, metaarsenito de sodio 2% y ácido acético 2%). Después de 20 min a temperatura ambiente se midió la absorbencia de las muestras a 850 nm.

4.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.

Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry modificado por Peterson (1977). Se llevó a cabo el procedimiento que se indica: a 0.9 ml. de agua bidestilada se añadieron de 2-5 μl de la muestra problema (si es homogenado sin núcleos 2 μl , si es fracción de membrana plasmática se añaden 2-5 μl de medio II como blancos). Se añadieron después 0.1 ml de DOC (desoxicolato de sodio) al 0.15 %, seguido por la adición del reactivo A (partes iguales de agua bidestilada, NaOH 0.8N, SDS al 10% y CTC que es una solución de Na_2CO_3 10%, CuSO_4 0.1% y $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 0.2%). Además de estos reactivos se añadieron 0.5 ml. de reactivo B (1 volumen de reactivo de Folin Ciocalteu más 5 volúmenes de agua bidestilada). Se esperó 30 minutos y se midió la absorbancia

4. MATERIALES Y MÉTODOS

de las muestras en un espectrofotómetro UV160 SHIMADZU a 750 nm. Para la curva estándar de proteína se usaron de 10 a 100 μg de BSA (Albúmina de suero de bovino), siguiéndose el mismo tratamiento indicado para las muestras.

4.9 CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO

Se añadieron cantidades equimolares de ATP y Mg al medio de reacción. El cálculo de las especies presentes a pH 7.0 se realizó considerando las constantes de disociación para las especies ácidas ATPH_2^{2-} y ATPH^{3-} expresadas como constantes de estabilidad global y las constantes de estabilidad global para los complejos ATPMg , ATPH_2Mg , ATPHMg^- y ATPMg^{2-} . Los valores usados fueron $7.3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}$ para ATPMg , $1.78 \times 10^{12} \text{ mol}^{-1}$ para ATPH_2Mg , $4.45 \times 10^9 \text{ mol}^{-1}$ para ATPHMg^- y $8.9 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1}$ para ATPMg^{2-} . El complejo predominante a pH 7.0 fue ATPHMg^- . Las concentraciones de sustrato usadas están expresadas en términos de la concentración de ATPHMg^- , las cuales se calcularon por un programa de computadora (FORTRAN IV) según lo describen O'Sullivan y Smitthers (1979).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.10 ANÁLISIS CINÉTICO.

Los datos de hidrólisis de ATP a diferentes concentraciones de sustrato fueron analizadas usando un programa de regresión no-lineal, ajustándolos a la ecuación de tipo hiperbólico correspondiente a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Para el análisis de los datos de dobles expresados como recíprocos de la actividad de la ATPasa se utilizó un programa de regresión lineal que ajustaba los datos a la ecuación del recíproco de la ecuación de velocidad para inhibición del tipo acompetitivo:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right]$$

Para esta ecuación se considera $y = mx + b$, en donde m (pendiente) corresponde a K_m/V_{\max} y b (intercepto con el eje) corresponde a $1/V_{\max} [1 + [I]/K_i]$ y a la ecuación :

$$b = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max} K_i} [I] \text{ en donde el intercepto corresponde a } 1/V_{\max} \text{ y la pendiente a } 1/V_{\max} \cdot K_i.$$

Para la obtención de K_i se utilizaron los datos obtenidos del análisis de regresión lineal m y b , y entonces se despejó el valor K_i .

5. RESULTADOS

Primero se determinó el efecto de la FB_1 sobre la germinación de los embriones de maíz. Para esto se midió el porcentaje de germinación de los embriones de maíz durante un período de aproximadamente 100 horas según se describe en la sección 4.3 de materiales y métodos. Los datos obtenidos se representan en la fig. 6. En esta figura se observa que el porcentaje máximo de germinación de los embriones control fue de 90 a 100% y el de los embriones embebidos con FB_1 en una concentración de $20 \mu M$ de un 85%. También se observó que la P_{50} , es decir, el tiempo de imbibición en el cual la población de embriones ya ha germinado en un 50%, para los embriones control fue de 24 horas mientras que para los embriones embebidos con FB_1 era de 48 horas. Esto indicaba que la FB_1 no suprime significativamente el porcentaje máximo de germinación de los embriones pero si afecta la velocidad en que estos embriones germinan.

A partir de éstos datos se seleccionó un tiempo de 24 horas para la imbibición de los embriones de los que se obtendrían vesículas de membrana plasmática para los estudios de actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. A las 24 horas de imbibición el porcentaje de germinación de la población de embriones fue del 50% o más, y fue un tiempo al cual no había riesgo de contaminación o crecimiento de microorganismos en los embriones o en el medio de imbibición, lo cual facilitó su manipulación.

En la hipótesis se había planteado que la naturaleza anfipática de la molécula de la fumonisina B_1 la hacía un buen candidato para interactuar con la membrana plasmática de las células del embrión de la semilla de maíz. El observar el efecto de la FB_1 sobre al menos una propiedad membranar nos proporcionaría una prueba de esta posible interacción con la membrana plasmática. Una de las propiedades que pueden ser modificadas por la acción de la molécula de la FB_1 es la permeabilidad membranar. Un método rápido y simple aunque indirecto de medir la integridad de las membranas celulares y por tanto de su permeabilidad, es la cuantificación de la fuga de solutos o en este caso electrolitos, a través de las membranas celulares por la medición de la conductancia eléctrica en un fluido como agua desionizada. Se realizó la medición de los electrolitos liberados por los embriones en agua desionizada después de una imbibición de 24 horas en ausencia y en presencia de 10 y $20 \mu M$ la FB_1 . Los resultados obtenidos se grafican en la fig. 7, en donde se observa inicialmente que hay una fuga rápida de electrolitos en los primeros minutos de la medición posteriormente esta fuga va siendo menor hasta llegar a una meseta, donde los incrementos de la conductancia en función del tiempo es muy lenta. De

5. RESULTADOS

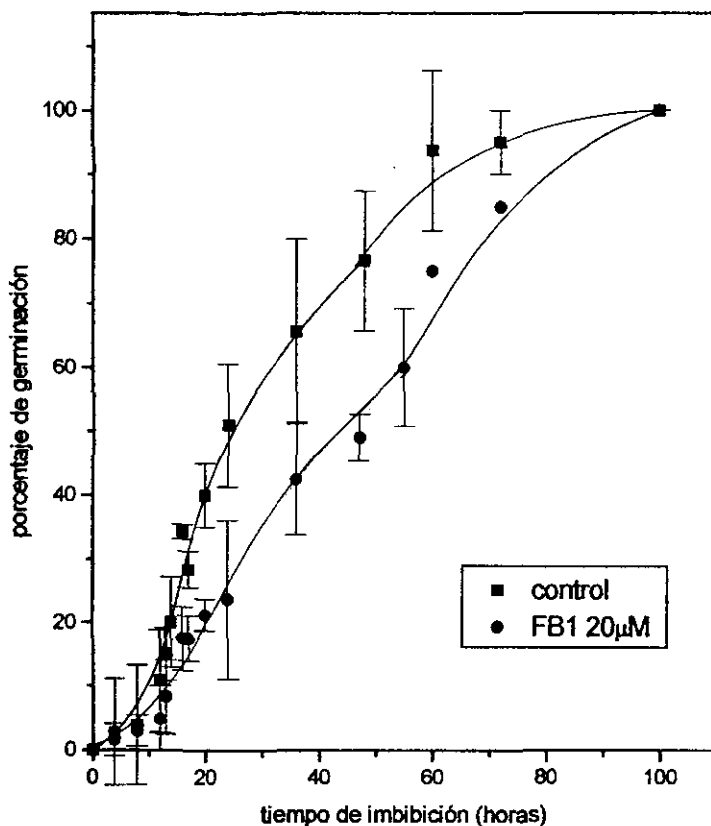


Fig. 6 Curva de viabilidad de embriones de maíz del híbrido H-355 en ausencia y en presencia de FB_1 en concentración $20 \mu M$. 20 embriones de maíz se embibieron el tiempo especificado según se describe en la sección 4.2 de materiales y métodos adicionando al medio de imbibición la FB_1 a una concentración de $20 \mu M$, para cada experimento se incluyó un control 20 embriones embibidos sin FB_1 . En esta figura se representa los valores del promedio y desviación estándar de 5 experimentos independientes. Las medias de las curvas de germinación control y con FB_1 son significativamente diferentes entre sí en los periodos de tiempo de 16-60 horas de imbibición, esto es en base a pruebas de la t de Student donde $P < 0.05$

5. RESULTADOS

aquí se obtiene que el porcentaje máximo promedio de electrolitos liberados por los embriones embebidos sin fumonisina (control) fue de un 26% mientras que para los embriones embebidos en presencia de la FB₁ 10 y 20 μM fue de 39.6% y 43% respectivamente, lo que representa un 52% y 65% sobre el valor promedio del control para cada una de las concentraciones de la FB₁ utilizadas en la imbibición. Esta diferencia se hizo más evidente a tiempos largos de la determinación de electrolitos.

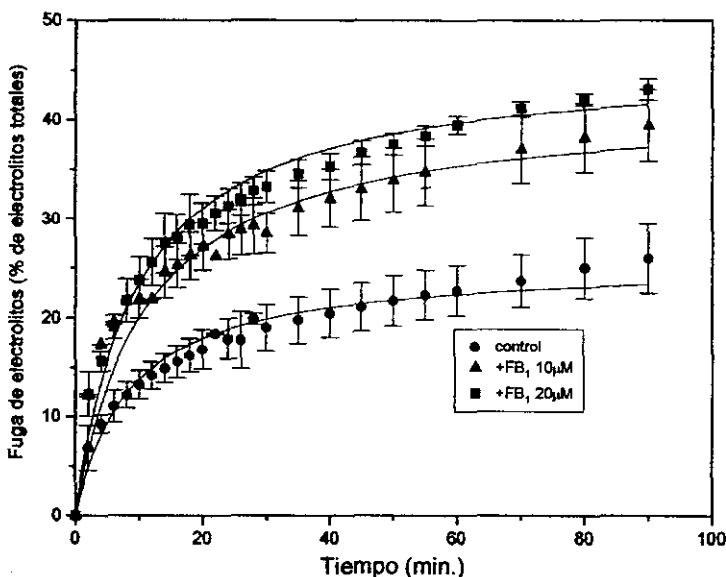


Fig. 7. Medición de la conductancia eléctrica de electrolitos liberados de embriones de maíz en agua desionizada. 20 embriones de maíz por tratamiento fueron embebidos en la ausencia y presencia de la FB₁ por 24 horas. Posteriormente fueron transferidos a agua desionizada para medir la conductancia eléctrica del fluido a los tiempos indicados en la gráfica.

5. RESULTADOS

Para poder observar si la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, era afectada por la FB_1 realizamos dos tipos de experimentos: 1) medición de la actividad de hidrólisis de ATP de vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz que habían sido embebidos 24 horas en ausencia de la FB_1 y en presencia de esta toxina en concentraciones de 10 y 20 μM (experimentos de la acción de la toxina *in vivo*) y 2) medición de la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de la FB_1 10 y 20 μM adicionada al medio de reacción de la actividad de la enzima, la cual se encontraba en vesículas de membrana plasmáticas de embriones embebidos 24 horas sin la FB_1 (experimentos de la acción de la toxina *in vitro*).

Estos dos tipos de experimentos dieron información del efecto de la FB_1 sobre la actividad de la ATPasa 1) *in vivo* y 2) *in vitro*. En el primer sistema podrán participar elementos membranales y citosólicos, ya que las membranas y las células en general son expuestas *in situ* a la toxina. En el segundo sistema podrán involucrarse sólo elementos membranales ya que la toxina es añadida a una preparación de membranas plasmáticas (como se describe en la sección 4.6). Los resultados obtenidos se presentan en las tablas I y II. En estas tablas se presentan las actividades de hidrólisis de ATP totales (o sea toda la hidrólisis de ATP presente en la preparación membranal), así como la actividad de hidrólisis de ATP correspondiente a la ATPasa de la membrana plasmática. Esta última medida de dos maneras: una indirecta (i) y otra directa (d) como la actividad de hidrólisis de ATP no inhibida por azida (inhibidor de la ATPasa mitocondrial) y como la actividad de hidrólisis de ATP inhibida por vanadato (inhibidor específico de la ATPasa de membrana plasmática). Por ello se calculó la diferencia entre la actividad de hidrólisis de ATP total (la actividad en ausencia de inhibidores de ATPasas) y la actividad de hidrólisis de ATP que fué inhibida por azida o vanadato.

En la tabla I se presenta el efecto *in vivo* de la FB_1 en las actividades de hidrólisis de ATP, obteniéndose que la actividad total de hidrólisis de ATP era inhibida entre un 18 y un 20 % en embriones embebidos con la FB_1 10 y 20 μM respectivamente, comparado con el control.

Se encontró que la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática se inhibió cuando los embriones se embebieron con la FB_1 siendo la inhibición de un 35-43 % (considerando las formas directa e indirecta de medir la actividad de ATPasa de la membrana plasmática) a la concentración 10 μM y de 24-30% a la concentración de FB_1 20 μM . Es importante hacer notar que los resultados obtenidos de las dos formas en que se mide la actividad de ATPasa de membrana plasmática son muy similares lo que nos da confianza en los valores medidos de esta actividad.

5. RESULTADOS

TABLA I.- EFECTO *IN VIVO* DE FUMONISINA B₁ SOBRE LA HIDRÓLISIS DE ATP DE EMBRIONES DE MAÍZ. 5.0 g. de embriones de maíz del híbrido H-355 se embebieron durante 24 horas con FB₁ adicionada al medio de imbibición en concentraciones de 10 y 20 μ M (el control proviene de embriones embebidos en las mismas condiciones que los anteriores pero en ausencia de la toxina). De los embriones embebidos en este período se obtuvieron las vesículas de membrana plasmática con las que se midió la hidrólisis de ATP por dos horas, conteniendo en el medio de reacción una concentración final de sustrato ATP-Mg de 8.11 mM a pH de 7.0. La reacción de hidrólisis de ATP se comenzó adicionando al medio de reacción de 5-10 μ g de proteína membranaral. La actividad total de hidrólisis de ATP es la actividad medida en ausencia de inhibidores específicos de ATPasas. La actividad de ATPasa de membrana plasmática se determinó por medir la hidrólisis de ATP en presencia de azida de sodio (ATPasa de MP_(i)) y también por medir la actividad de la hidrólisis total de ATP que es inhibida por vanadato de sodio (ATPasa de MP_(d)).

Actividad	Hidrólisis de ATP (nmolPi/mg proteína/h)				
	Control	10 μ M FB ₁	%Inhibición FB ₁	20 μ M FB ₁	%Inhibición FB ₁
Total	1357 \pm 124	1091 \pm 123*	20	1114 \pm 333*	18
ATPasa de MP _(i)	1094 \pm 114	621 \pm 138* ⁺	43	762 \pm 136* ⁺	30
ATPasa de MP _(d)	1025 \pm 134	669 \pm 193 *	35	781 \pm 144	24

(i) = Actividad medida como insensible a azida.

(d) = Actividad medida como sensible a vanadato

* Estas medias son significativamente distintas del control sobre la base de la prueba estadística de la *t* de Student en la que $P < 0.05$.

⁺ Estas medias son estadísticamente distintas entre sí

5. RESULTADOS

Cuando el efecto de la FB_1 sobre la ATPasa se midió *in vitro* se observó que la actividad total de hidrólisis de ATP se inhibió de un 23-26% cuando se añadió FB_1 al medio de reacción de hidrólisis de ATP. La actividad de hidrólisis de ATP correspondiente a la ATPasa de la membrana plasmática disminuyó con respecto al control un 31% al agregarse una concentración de 10 μM de FB_1 y de un 23-28% a una concentración de 20 μM de FB_1 en el medio de hidrólisis de ATP.

Ya que el efecto de la FB_1 sobre la ATPasa era inhibitorio, se exploró el tipo de inhibición que esta toxina producía con estudios clásicos de cinética. Lo primero que se hizo fue medir la actividad de la enzima a diferentes concentraciones del sustrato ATP-Mg (ATPHMg es la especie predominante a pH= 7, que es el pH al cual se realizó el experimento). Todas las mediciones de la actividad se hicieron sin agregar la FB_1 al medio de hidrólisis de ATP. De esta manera obtuvimos el patrón del comportamiento cinético de la enzima en ausencia del inhibidor.

Los resultados de estos experimentos se muestran en las gráficas de actividad de hidrólisis de ATP vs la concentración de ATPHMg (Fig. 8). Los datos calculados de K_m y V_{max} para cada experimento independiente, se muestran en la tabla III. Como se puede observar de las gráficas, en ocho diferentes experimentos la enzima presentó un comportamiento cinético que se ajustó matemáticamente a una curva hiperbólica, que corresponde a un sistema saturable, del tipo que describe la ecuación de Michaelis-Menten. Esto se corroboró en los regráficos de los dobles recíprocos de los datos de en las gráficas anteriores. En estos gráficos se observó el trazo de una línea recta que corresponde al patrón de enzimas michaelianas en las gráficas tipo Lineweaver-Burk. En la tabla III se pueden observar los valores de K_m y V_{max} calculados de los experimentos realizados ($n= 7$), en donde el valor promedio para K_m fue de 1.24 mM y el de V_{max} de 2311 nmolPi/mg/h.

5. RESULTADOS

TABLA II.- EFECTO *IN VITRO* DE FB₁ SOBRE LA HIDRÓLISIS DE ATP EN VESÍCULAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE EMBRIONES DE MAÍZ. Se embebieron embriones de maíz del híbrido H-355 durante 24 horas, posteriormente de estos embriones se obtuvieron las vesículas de membrana plasmática con las cuales se midió la hidrólisis de ATP (total, de ATPasa de MP_(i) y de ATPasa de MP_(d)) en las mismas condiciones del experimento anterior, pero en presencia de FB₁ al medio de hidrólisis de ATP en concentraciones de 10 y 20 μ M.

	Hidrólisis de ATP (nmolPi/mg proteína/h)				
	Control	10 μ M	%Inhibición	20 μ M	%Inhibición
		FB ₁	FB ₁	FB ₁	FB ₁
Total	1613 \pm 554	1247 \pm 262	23	1191 \pm 359*	26
ATPasa de MP _(d)	973 \pm 388	672 \pm 129 *	31	747 \pm 355	23
ATPasa de MP _(i)	1347 \pm 396	931 \pm 76*	31	976 \pm 106*	28

(i) = Actividad medida como insensible a azida.

(d) = Actividad medida como sensible a vanadato

* Estas medias son significativamente distintas del control sobre la base de la prueba estadística de la *t* de Student en la que $P < 0.05$.

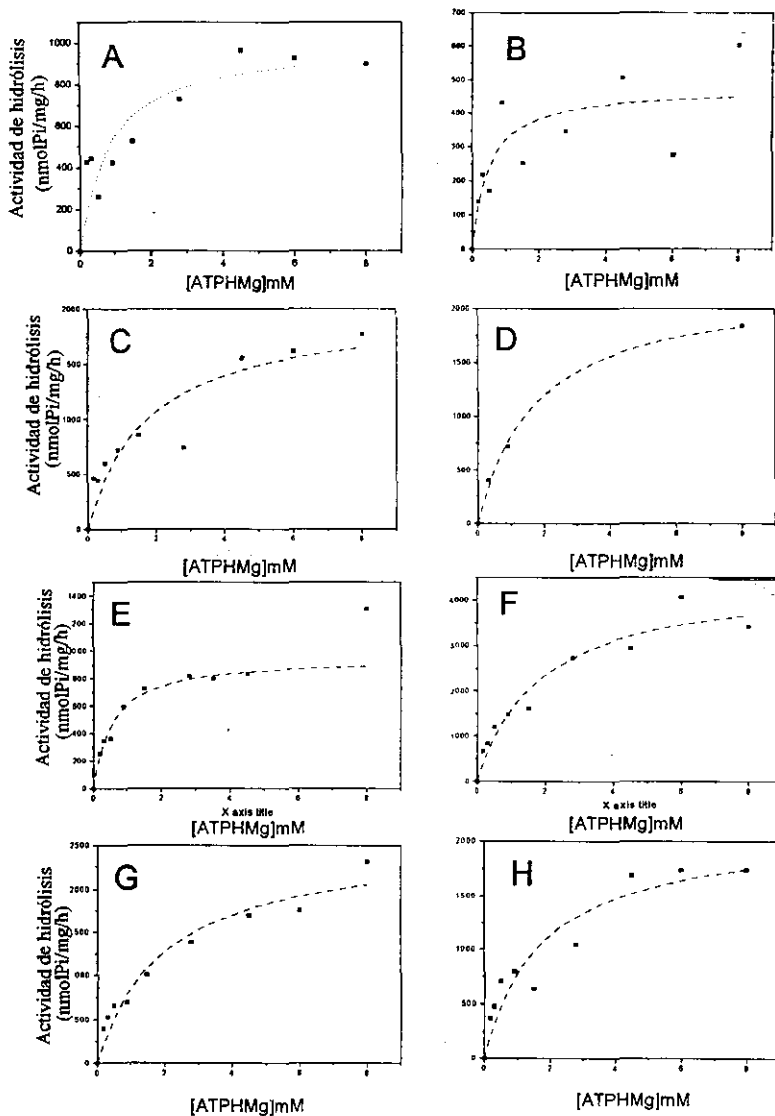


Fig. 8. Cinética de hidrólisis de ATP de la ATPasa de la membrana plasmática de embriones de maíz embebidos 24 horas en ausencia de la FB_1 . Se realizó la medición de la hidrólisis de ATP variando la concentración de sustrato ATPHMg como se describe en materiales y métodos. La actividad de membrana plasmática se midió como la actividad de hidrólisis de ATP insensible a azida. Se presentan aquí los datos de 7 experimentos independientes, cada punto es el promedio de un triplicado. Los resultados se ajustaron por análisis de regresión no-lineal a la ecuación de una enzima que se comporta según la ecuación de Michaelis-Menten.

5. RESULTADOS

TABLA III- CONSTANTES CINÉTICAS CALCULADAS PARA LA ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE ATP DE LA ATPASA DE H⁺ MEMBRANA PLASMÁTICA DE EMBRIONES DE MAÍZ GERMINADOS DURANTE 24 HORAS. De embriones embebidos durante 24 horas se obtuvieron vesículas de membrana plasmática y se midió la hidrólisis de ATP con concentraciones de sustrato ATPMg de 0.18, 0.3, 0.5, 0.9, 1.5, 2.8, 4.5, 6.0, 8.0 mM. La concentración de Mg²⁺ libre se mantuvo constante a 0.035 mM. Los resultados obtenidos se procesaron con un programa de análisis no lineal correspondiente a una curva hiperbólica correspondiente a la ecuación de Michaelis-Menten. De este análisis se obtuvieron los valores correspondientes a V_{max} y K_m.

A. Experimento	Constantes cinéticas	
	K _m (mM)	V _{max} (nmolPi/mg/h)
1	1.62	1167.13
2	0.47	557.92
3	1.62	2080.97
4	0.58	958.75
5	1.04	2009.41
6	2.17	2453.12
7	1.2	3845.76

B.	Valores promedios	
	K _m promedio (mM)	V _{max} promedio (nmolPi/mg/h)
	1.24 ± 0.61	2311 ± 978

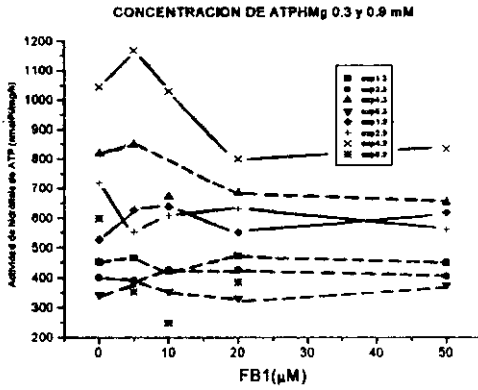
5. RESULTADOS

Habiéndose establecido el comportamiento cinético de la enzima y sus constantes cinéticas, se procedió a realizar la medición de la actividad de ATPasa de membrana plasmática a distintas concentraciones del sustrato y bajo diferentes concentraciones de la FB_1 . Los resultados obtenidos se graficaron como el porcentaje de actividad con respecto al control (actividad de ATPasa medida sin FB_1), en función de la concentración de FB_1 y se presentan en la figura 9A-F. Se observó que a medida que se incrementó la concentración de sustrato para medir la actividad de la enzima, en presencia de distintas concentraciones de FB_1 las pendientes de las curvas trazadas se fueron haciendo más negativas. De los datos de estas familias de curvas se calculó la I_{50} , es decir la concentración de FB_1 a la cual se inhibe el 50% de la actividad de la enzima (Tabla IV). Se obtuvo que a concentraciones de 0.3 y 0.9 de ATPHMg, las concentraciones de FB_1 que se necesitaban para inhibir la actividad de esta enzima eran enormes. Sin embargo, a medida que se incrementaba en el medio de reacción la concentración del sustrato, disminuía la cantidad de FB_1 que se necesitaba para inhibir parcialmente la actividad de la enzima, hasta llegar a la concentración de sustrato de 8.0 mM, con la cual la concentración de FB_1 necesaria para inhibir la actividad de la enzima un 50% es de 33.8 μ M.

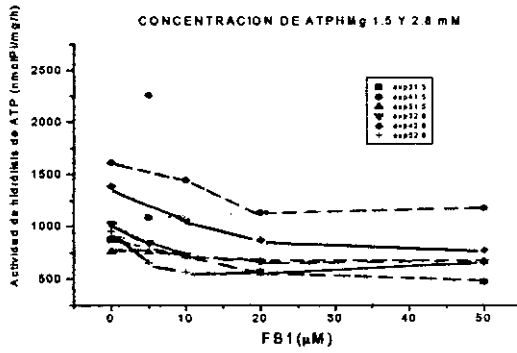
Para obtener las constantes cinéticas de actividad de hidrólisis de ATP en presencia de FB_1 se graficaron las actividades obtenidas en función de la concentración del sustrato ATPHMg. La gráfica que se obtuvo se presenta en la figura 10A. Aquí se observa claramente que si se traza una curva para cada concentración de FB_1 probada a lo largo de varias concentraciones de sustrato, la concentración de sustrato con la cual se llega a la saturación de la enzima es menor a medida que se aumenta la concentración de FB_1 . Esto se observa claramente por los valores de la V_{max} y de la K_m calculados para cada una de estas curvas (Tabla V). Dicho de otra manera, concentraciones altas de sustrato parecen favorecer el efecto inhibitorio de la FB_1 .

5. RESULTADOS

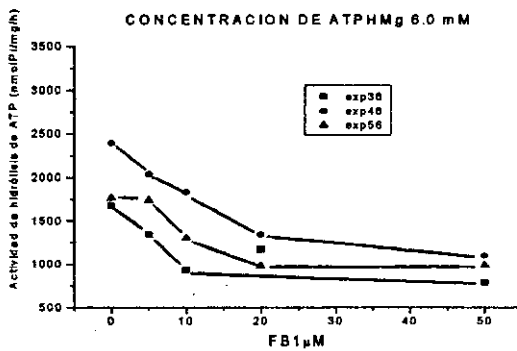
A)



B)

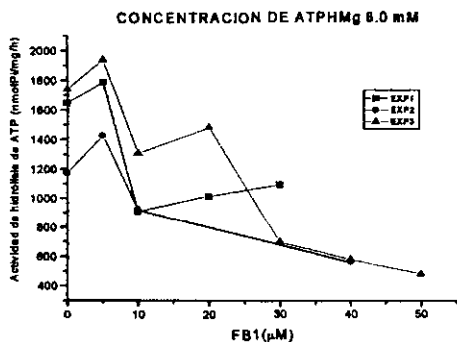


C)

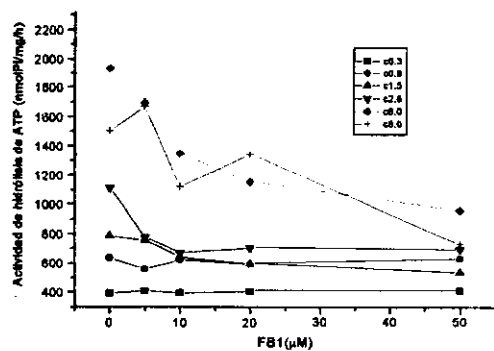


5. RESULTADOS

D)



E)



F)

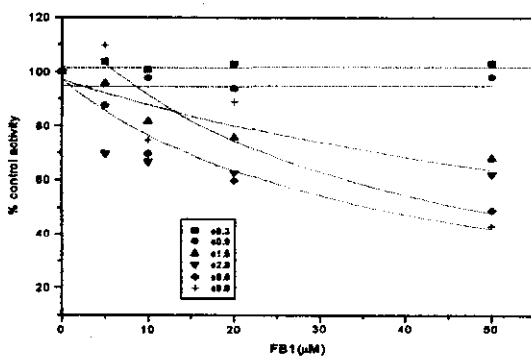


Fig. 9. Efecto de la concentración de FB₁ sobre la actividad de ATPasa de

5. RESULTADOS

diferentes preparaciones de membranas plasmáticas en presencia de FB_1 , cuando se varía la concentración de sustrato ATPHMg. Se midió la hidrólisis de ATP de la enzima en presencia de concentraciones de FB_1 entre 5 y 50 μM y a distintas concentraciones de sustrato ATPHMg : A) 0.3 (líneas discontinuas), 0.9 (líneas continuas), B) 1.5 (líneas discontinuas), 2.8 (líneas continuas), C) 6.0 y D) 8.0 mM. Las curvas representadas de A)-D) corresponden a experimentos independientes. E) Actividad de hidrólisis de ATP promedio en presencia de FB_1 5-50 μM para 0.3, 0.9, 1.5, 2.8, 6.0 y 8.11 mM de ATPHMg. F) Actividad de hidrólisis de ATP en presencia de FB_1 , representada como porcentaje de actividad con respecto al control (actividad de hidrólisis de ATP en ausencia de FB_1) en las concentraciones de ATPHMg: 0.3, 0.9, 1.5, 2.8, 6.0 y 8.11 mM, mismas que se muestran en E).

TABLA IV.- I_{50} PARA LA FB_1 CALCULADAS PARA LA HIDRÓLISIS DE ATP A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO. La actividad de hidrólisis de ATP fue medida en vesículas de membrana plasmática de embriones embebidos 24 horas (sin la FB_1). En este experimento se realizaron las mediciones con concentraciones de sustrato de ATPHMg de 0.3, 0.9, 1.5, 2.8, 6.0 y 8.0 mM. Para cada una de las concentraciones de sustrato se midió la hidrólisis de ATP adicionando al medio de hidrólisis concentraciones de la FB_1 de 5, 10, 20 y 50 μM . Los cálculos de la I_{50} se realizaron con un programa de computadora con la ecuación de I_{50} que es $A_0 \cdot I_{50} / I_{50} + X$.

ATPHMg (mM)	I_{50} (μM)
0.3	∞
0.9	∞
1.5	95.1
2.8	82.8
6.0	38.0
8.0	33.8

5. RESULTADOS

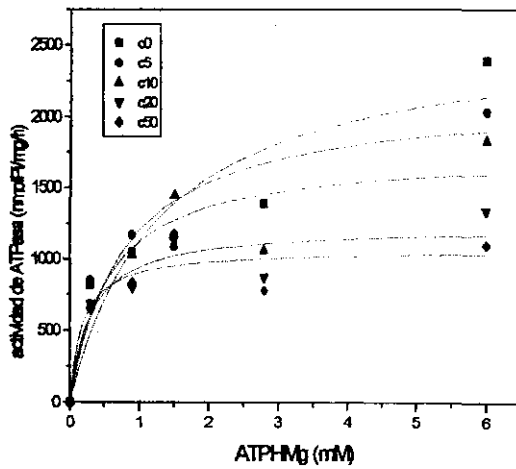
TABLA V.- CONSTANTES CINÉTICAS CALCULADAS PARA LA ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE ATP DE LA ATPASA DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE FB₁. De embriones embebidos durante 24 horas se obtuvieron vesículas de membrana plasmática y se midió la hidrólisis de ATP con concentraciones de sustrato ATPHMg de 0.18, 0.3, 0.5, 0.9, 1.5, 2.8, 4.5, 6.0, 8.0 mM. Para cada una de estas concentraciones de sustrato se midió la actividad de hidrólisis en presencia de concentraciones de la FB₁ entre 5, 10, 20 y 50 μ M. Los resultados obtenidos se procesaron con un programa de análisis no lineal como en el caso de los datos de la tabla V.

Constantes cinéticas		
FB ₁ (mM)	Km (mM)	V _{max} nmolPi/mg/h
0	1.32	2608.30
5	0.78	2141.18
10	0.56	1742.39
20	0.30	1226.18
50	0.18	1065.49

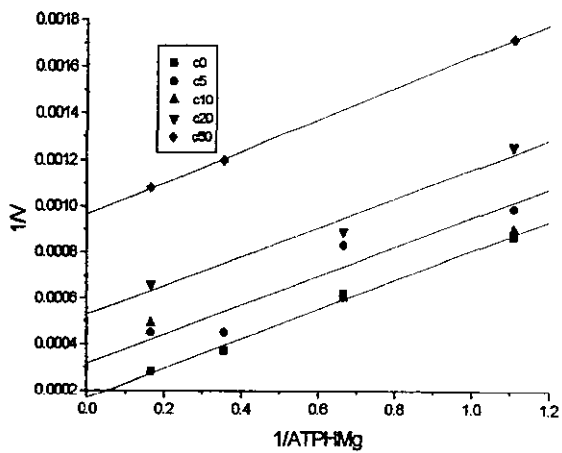
Para determinar el tipo de inhibición que producía la FB₁ se realizó el gráfico de los recíprocos, es decir el inverso de la actividad de ATPasa vs. el inverso de la concentración de sustrato. Como se observa en la figura 10B se obtuvo un conjunto de rectas paralelas, las cuales intersectan el eje 1/V (inverso de la velocidad de la enzima) dando valores menores a medida que se incrementa la concentración de la FB₁. Este es un patrón típico de una inhibición del tipo acompetitivo. Esto fue corroborado por el gráfico de Dixon (1/V vs concentración de la FB₁), el cual también presentó un patrón de rectas paralelas, característico de acompetitividad. A partir de estos datos se graficaron los valores de los interceptos de las rectas trazadas en función de la concentración de FB₁ y se calculó la K_i (según se describe en la sección 4.10 de la sección de materiales y métodos) para una inhibición del tipo acompetitivo, obteniéndose un valor de 10.5 μ M.

5. RESULTADOS

A)



B)



5. RESULTADOS

C)

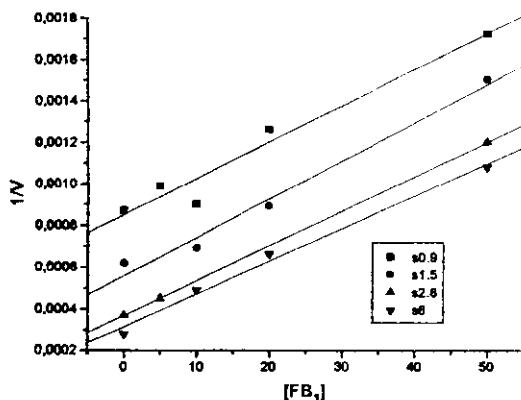


Fig. 10. Determinación del tipo de inhibición de la FB₁ sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática por análisis cinético. A) Se presenta la actividad de hidrólisis de ATP en función de la concentración de sustrato ATPHMg, para concentraciones de FB₁ añadida al medio de hidrólisis de 5, 10, 20 y 50 μM. Los resultados obtenidos se procesaron matemáticamente con un programa de análisis no-lineal. B) y C) Gráficos de Lineweaver-Burk y Dixon para la determinación del tipo de inhibición de la FB₁ sobre la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. De los datos obtenidos de la figura A) se calcularon los recíprocos de la actividad versus el recíproco de la concentración de sustrato para cada una de las concentraciones de la FB₁ que se usaron en B) y C). A los resultados obtenidos se aplicó un programa de análisis de regresión lineal.

FALTA PAGINA

No. 47

6. DISCUSIÓN.

Efecto de la FB₁ sobre la germinación de embriones de maíz.

El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto de la micotoxina fumonisina B₁ en la membrana plasmática de plantas, específicamente sobre la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de embriones de maíz en germinación. Ya se había reportado que la FB₁ tenía propiedades fitotóxicas hacia varias especies de plantas, entre ellas el maíz (Van Asch *et al.* 1992) y se ha observado que la producción de esta toxina por *F. moniliforme* tiene un papel importante en la virulencia de este microorganismo en plántulas de maíz (Desjardins *et al.* 1995). Además de estos datos en estudios efectuados sobre el efecto de FB₁ en la germinación de semillas de maíz, se reportó que la FB₁ no inhibía la emergencia de la radícula, es decir no inhibía la germinación, y que al variar la concentración de FB₁ de 1.4 µM a 140 µM no había diferencia en los porcentajes máximos de germinación de las semillas. Sin embargo, sí se observaba diferencia en el crecimiento de la radícula al incrementar la concentración de la FB₁ en el tratamiento de las semillas de maíz en germinación, disminuyendo el crecimiento de la radícula en las semillas con siete días de germinación (Doehlert *et al.* 1994). Durante el presente estudio del efecto de la FB₁ en los embriones de la semilla de maíz, se encontró también que la FB₁ no inhibía la germinación, puesto que los porcentajes máximos de germinación de los embriones embebidos con la FB₁ en concentración 20 µM fueron similares al que presentaban los embriones embebidos sin la FB₁. Sin embargo, el hecho de que la germinación fuera más lenta en embriones tratados con la FB₁, puede ser consecuencia del efecto inhibitorio de la FB₁ sobre el crecimiento de la radícula, ya que se considera germinado un embrión cuya radícula mide 2 mm. de longitud. Aunque aún no se ha dilucidado el mecanismo por el cual la FB₁ inhibe el crecimiento radicular, sí se ha observado que la FB₁ inhibe amilasas de bajo pI que pueden ser importantes para la hidrólisis del almidón durante el proceso de germinación (Doehlert *et al.* 1994), además de que los productos de hidrólisis de este material de reserva son importantes para el crecimiento celular, especialmente para las células de la radícula (Simon, 1984). Otra posibilidad es que el transporte de estos productos del almidón y de otros hacia la células de la radícula se viera afectado por la acción de la FB₁, haciéndolo más lento. Dentro de esta posibilidad una de las actividades importantes que podría resultar afectada es la de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, toma parte en el funcionamiento de sistemas de transporte de nutrientes (Michelet y Boutry, 1995), así como para el crecimiento celular (Hager *et al.* 1991).

Efecto de la FB₁ sobre la permeabilidad membranal de embriones de maíz en germinación.

Un hecho bien documentado es que cuando las semillas se ponen a germinar, la imbibición en agua es acompañada por una fuga de solutos como iones, además de una gran variedad de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos. La fuga de estos componentes

6. DISCUSIÓN.

es mayor en embriones de las semillas en las que se ha removido la testa. Se sabe que esta fuga de sustancias proviene del citoplasma y la vacuola, lo cual no debería ocurrir debido a que éstas son retenidas naturalmente por la membrana plasmática de las células. Se ha propuesto que las membranas celulares más extensas, tonoplasto y membrana plasmática, han perdido su integridad durante la etapa final de la formación de la semilla y el posterior estado seco. Esta pérdida de capacidad retentiva se expresa al primer contacto con el agua de imbibición. Pero a medida que la imbibición continúa, la integridad membranal se restablece, disminuyendo la fuga de posterior solutos (Simon y Raja-Harun, 1972).

En concordancia con lo dicho anteriormente, se ha reportado que algunas toxinas, especialmente toxinas no-selectivas del hospedero, ocasionan en plantas un incremento en la pérdida de iones celulares y/o agua. En general, éstas son toxinas con estructuras anfipáticas, es decir, estructuras tipo detergente (como por ejemplo beticolinas, siringomicina y ácido fusárico), las cuales podrían interactuar directamente con la fase lipídica de la membrana plasmática, interrumpiendo la estructura membranal. Sin embargo, no se puede descartar un efecto subsecuente en las endomembranas celulares, particularmente al incrementar las concentraciones de la toxina (Kauss, 1990). La FB_1 con su estructura anfipática podría ser un caso parecido, ya que se reportó que cuando se expusieron discos de hoja de *Datura stramonium* a diferentes concentraciones de FB_1 en condiciones de luz u oscuridad y por diferentes tiempos, se observó una fuga de electrolitos que era proporcional a la concentración de FB_1 y al tiempo de exposición a la toxina (Abbas, *et al.* 1992). Este efecto sobre la permeabilidad membranal podría presentarse en los embriones de maíz expuestos a la FB_1 , y de encontrarse, podría constituir un indicio inicial de un efecto de la FB_1 sobre la membrana plasmática. Los resultados obtenidos indicaron una liberación de electrolitos de embriones embebidos durante 24 horas con la FB_1 . La cantidad máxima de electrolitos liberados y medidos por la conductancia eléctrica del fluido (agua), fue superior para los embriones embebidos por 24 horas en presencia de FB_1 (52% y 65% sobre el control para 10 y 20 μM de FB_1 respectivamente). Esto es semejante al efecto de la FB_1 reportado para *Datura stramonium* pero además se observó en los experimentos con hojas de esta planta que la fuga de electrolitos era máxima después de 24 horas de exposición a la toxina. Esto sugería perturbaciones membranales significativas por efecto de la toxina, lo cual se corroboró por estudios ultraestructurales del tejido del mesófilo en donde se reportó que las células presentaban ruptura de estructuras membranosas como la membrana plasmática y el tonoplasto, así como dispersión del citoplasma. Esto estaría de acuerdo con la fuga de electrolitos presentada por los discos de las hojas. De hecho, se sugirió que el sitio primario de acción era la membrana plasmática o el tonoplasto, con los subsecuentes efectos de acción era la membrana plasmática o el tonoplasto, con los subsecuentes efectos hacia el citoplasma, probablemente además de la contribución de esta toxina a la interrupción del metabolismo de lípidos, lo cual llevaría a un deterioro membranal y a disfunciones en los sistemas de transducción de señales (Abbas *et al.* 1992).

Ya que la FB_1 es un ácido aminopolicarboxílico que tiene una estructura lipofílica parecida a la de una base esfingoidéa, podría interactuar con la fase lipídica de la

6. DISCUSIÓN.

membrana. Una evidencia de esta premisa es que se ha detectado por ESR (electron spin resonance) que la FB_1 perturba el ordenamiento de las membranas e incrementa la permeabilidad membranal en liposomas de fosfatidilcolina de yema de huevo (Yin *et al.* 1998). El hecho de que las membranas de los embriones embebidos con la FB_1 liberen más electrolitos que los embriones control, indica que la FB_1 aumenta la permeabilidad de las membranas de las células embrionarias quizás por la inserción de moléculas de la FB_1 en la membrana lo cual produce efectos perturbadores en el empaquetamiento de la fase lipídica, o induciendo "huecos" en su estructura. En otro tipo de efecto muy interesante, se ha observado que las beticolinas, toxinas producidas por el hongo *Cercospora beticola*, presentan una estructura anfipática e inducen la formación de estructuras membranales tipo canales por la capacidad de esta toxina de ensamblarse de manera multimérica en la membrana. Estos canales tienen pobre selectividad, permitiendo la permeabilidad a distintos iones como Cl^- , K^+ , Na^+ y Ca^{2+} (Goudet *et al.* 1998).

Efecto de la FB_1 sobre la ATPasa de membrana plasmática.

Aún no se ha definido si el efecto de la FB_1 sobre la membrana plasmática es una acción primaria directa sobre la membrana o si éste sólo es un efecto secundario originado por el decaimiento celular, mediado por la interrupción del metabolismo de esfingolípidos o por la acumulación de sus precursores. Algunas toxinas que son no-selectivas del hospedero también afectan procesos específicos de transporte en la membrana plasmática, como en el caso de la fusicocina, la cual estimula el bombeo de H^+ en la membrana plasmática llevando a la célula a un desajuste metabólico (Rasi-Caldogno *et al.* 1993). Además se ha sugerido que la toxina beticolina-1 actúa directamente sobre la ATPasa de H^+ inhibiendo su actividad (Simon-Plas *et al.* 1996), así como la siringomicina y otros elicitores fungales que afectan la actividad de esta enzima a través de inducir procesos que producen la fosforilación o desfosforilación de esta enzima (Bidway *et al.* 1987; Vera-Estrella *et al.* 1994). Adicionalmente, es importante hacer notar que un análogo estructural de la FB_1 , la esfingosina, la cual se ha propuesto que tiene acción de segundo mensajero, inhibe a la ATPasa de Ca^{2+} de microsomas de páncreas de rata en un 50% a concentraciones menores a $25\mu M$ (Pandol *et al.* 1994), así como a la ATPasa de Na^+/K^+ de sinaptosomas de cerebro de rata con una I_{50} de $16\mu M$ (Oishi *et al.* 1990). Con estos antecedentes se decidió estudiar el efecto de la FB_1 sobre la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de los embriones de maíz en germinación.

a. Experimentos *in vivo*

En los estudios efectuados con FB_1 sobre la actividad que presentaba la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de los embriones expuestos a FB_1 , se observó una inhibición de aproximadamente 39% y 27% de la actividad de la enzima en vesículas de membrana plasmática obtenidas de embriones embebidos 24 horas en presencia de FB_1 10 y 20 μM respectivamente. Esta disminución de la actividad es interesante, ya que según los

6. DISCUSIÓN.

antecedentes de la literatura, la FB_1 puede tener un efecto perturbador en la membrana plasmática, así que podría estar interrumpiendo el ordenamiento de los lípidos que rodean a la ATPasa o interaccionando directamente con los dominios hidrofóbicos de la enzima. Esto sería plausible, ya que la composición y el estado físico de las membranas influyen sobre la conformación y actividad de muchas enzimas membranales y la ATPasa de H^+ en plantas no es la excepción. Se sabe que la actividad de esta enzima es muy susceptible a cambios en su entorno lipídico, probablemente porque se esté propiciando un ambiente lipídico desfavorable para la ATPasa, cuando sus lípidos esenciales son reemplazados por moléculas como las de los detergentes (Palmgren *et al.* 1990b).

b. Experimentos *in vitro*.

Sin embargo, también era importante saber si el efecto inhibitorio de la FB_1 sobre esta enzima membranal involucra solamente a la membrana plasmática o también podía estar mediado por elementos citoplásmicos, para lo cual la comparación de los resultados de nuestros ensayos *in vitro* e *in vivo* del efecto de esta toxina sobre la ATPasa nos reportó información muy valiosa. Lo que se observó en los ensayos *in vitro* también fué un efecto inhibitorio de la FB_1 sobre la actividad de esta enzima. Los resultados mostraban que en comparación con los resultados de los ensayos *in vivo*, el porcentaje de inhibición en ambas condiciones eran muy parecidos (31% y 26% para 10 y 20 μM respectivamente). Esto sugería que el efecto inhibitorio de la FB_1 sobre la actividad de la ATPasa era a nivel de la membrana plasmática, si bien en el caso de la inhibición de la actividad en embriones enteros, no se puede descartar la participación de elementos no membranales en el efecto observado por la toxina en la actividad de la ATPasa. Esta inhibición de la actividad podría atribuirse a una interacción directa de la FB_1 con la enzima, sustituyendo lípidos esenciales para la actividad de la enzima que proporcionan la conformación adecuada para la actividad óptima de la enzima (Palmgren *et al.* 1990b). Además de este efecto, en el caso de los experimentos con exposición directa de los embriones enteros a la FB_1 , se podría considerar un incremento en la inserción de bases esfingoideas o una disminución de esfingolípidos en la membrana, debido a una inhibición de la FB_1 sobre la ceramida sintasa. Con ello, también se influiría en el empaquetamiento original de los lípidos de la membrana o del entorno lipídico de la enzima. Es interesante hacer notar que fue siempre ligeramente mayor el porcentaje de inhibición de la actividad de ATPasa en los experimentos de medición de la actividad de la enzima que se realizaron con una concentración de FB_1 10 μM , comparándola con la inhibición producida con una concentración de FB_1 de 20 μM , a pesar de que se esperaba tener un efecto inhibitorio proporcional a la concentración de FB_1 . Esto podría explicarse por una saturación del fenómeno en este rango de concentraciones de FB_1 , ya que a menudo las toxinas ejercen efectos a concentraciones menores a 10 μM . Cuando se hace la comparación de los efectos de la FB_1 en los experimentos *in vivo* e *in vitro*, cabe hacer la consideración de que al añadir 10 ó 20 μM de FB_1 a las membranas plasmáticas, en el sistema *in vitro* prácticamente toda la toxina está accesible a las membranas, mientras que en el sistema *in vivo*, al agregar las mismas concentraciones de la FB_1 , es difícil que ésta en su totalidad

6. DISCUSIÓN.

alcance a la membrana plasmática, ya que otros componentes tisulares del embrión y del sistema de incubación mismo, pueden captar parte de la toxina antes de que ésta alcance a la membrana. De ser así, el efecto observado en los experimentos *in vivo* se obtendría a concentraciones mucho más bajas de FB₁ y también podría involucrar componentes celulares diferentes.

Se ha demostrado que esta acumulación de bases esfingoideas, especialmente de esfingosina y esfinganina, afecta múltiples vías reguladoras en la célula, lo cual incluye la inhibición de la proteína cinasa C, la fosfatasa del ácido fosfatídico, la ATPasa de Na⁺/K⁺ (Oishi *et al.*, 1990), cinasas c-src y v-src y otros sistemas, incluyendo la activación del receptor del factor EFG. Bajas concentraciones de estas bases esfingoideas son mitogénicas en algunas líneas celulares y en otras resultan, altamente citotóxicas (Merrill *et al.* 1993). Además, la esfingosina-1-fosfato, la cual es un intermediario de la degradación de estas bases, está implicada como un mediador de la liberación de calcio de reservorios intracelulares (Pandol *et al.* 1994). En nuestros experimentos *in vivo*, no podemos descartar que algunos de estos efectos de la FB₁ pueden existir en nuestro sistema.

Efecto de la FB₁ sobre la cinética enzimática de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

Habiéndose encontrado que el efecto de la FB₁ sobre la actividad de ATPasa de membrana plasmática era inhibitorio, se realizaron experimentos de cinética enzimática para tratar de averiguar el tipo de inhibición que la FB₁ producía sobre ésta, lo cual nos podría dar una idea del mecanismo de acción de la FB₁ sobre la ATPasa de H⁺. Lo que se obtuvo de los datos cinéticos con esta enzima en ausencia de FB₁, fue un comportamiento del tipo Michaelis-Menten, indicando que la enzima es una enzima no cooperativa, lo cual ya se había reportado para la enzima de raíces y hoja de maíz (Dupont *et al.* 1981; Perlín y Spanswick, 1981; Gallagher y Leonard, 1982). Además, se obtuvo una K_m promedio para ATP de 1.24 mM, misma que está dentro del rango de Km reportada en otros tejidos y en otras especies de plantas, como por ejemplo en células guarda de *Vicia faba* con una K_m de 1.0 mM y en mesófilo de esta misma especie de 1.2 mM para ATP (Becker *et al.* 1993); para raíces de maíz el valor encontrado fue de 0.7 mM para ATP (De Michaelis y Spanswick, 1986), 0.89 mM (Gallagher y Leonard, 1982) y otro reporte de 1.3 mM (Dupont *et al.* 1981), hasta un valor de 0.39 mM para ATP en coleoptilos de maíz (Hager y Biber, 1984) y de 0.31 mM en hojas de maíz (Perlín y Spanswick, 1981).

Sin embargo, al realizar los experimentos de cinética en presencia de FB₁, se observó que no se presentaba inhibición de FB₁ sobre la actividad de la enzima a concentraciones de sustrato (ATPHMg) cercanas o muy por debajo de la K_m. A concentraciones cercanas a la saturación (entre 1.5 y 2.8 mM de sustrato), se observaba una inhibición moderada. Pero a concentraciones de sustrato saturantes de la enzima, (6.0 y 8.0 mM de ATPHMg), se observaba una inhibición significativa de la actividad de hidrólisis de

6. DISCUSIÓN.

ATP. El hecho de que a concentraciones bajas de sustrato no se presentara inhibición y de que a medida que aumentaba la concentración de sustrato se observaba una mayor inhibición, es algo característico de una inhibición de tipo acompetitivo y descarta por tanto la inhibición del tipo competitivo, ya que este tipo de inhibición disminuye a medida que se incrementa la concentración de sustrato. Para poder asegurar que esto era así, también se calcularon las K_m y V_{max} experimentales y se observó que había disminución en el valor de ambas constantes, lo cual también es característico de la inhibición del tipo acompetitivo, a diferencia de lo que se presenta en una inhibición del tipo no competitivo, en donde al agregarse el inhibidor, la K_m no cambia pero sí la V_{max} . Al revisar el regráfico de los dobles recíprocos, observamos una serie de rectas paralelas, lo cual es el patrón típico de inhibición del tipo acompetitivo.

Este tipo de inhibición ha tratado de explicarse por medio del modelo donde el inhibidor, en este caso la FB_1 , tiene que unirse al complejo formado por la enzima y su sustrato, de tal manera que forma un nuevo complejo enzima-sustrato-inhibidor, el cual va a ser inactivo, por lo que no llevará a cabo la catálisis. Entre mayor sea la concentración de sustrato, mayor será la concentración del complejo enzima-sustrato, especie a la que se une el inhibidor y por tanto mayor será la inhibición sobre la enzima. El hecho de que la K_i sea de $10.5 \mu M$, nos sugiere que la afinidad de la FB_1 por la enzima es grande para la formación del complejo EIS. Este valor está en el rango de las K_i para otros inhibidores de la ATPasa, algunos tan específicos como el inhibidor clásico de la ATPasa, el vanadato, cuya K_i va desde 1 a $10 \mu M$ (O'Neill y Spanswick, 1984). En estudios cinéticos efectuados con beticolina-1 se ha observado que esta toxina produce una inhibición de la ATPasa del 50 % a concentraciones de la toxina de 1.5 a $4.5 \mu M$, por lo cual se ha sugerido que la enzima es un objetivo directo de esta toxina. De hecho se observó que la beticolina-1 bloquea la transición del intermediario fosforilado del ciclo catalítico de la enzima de E_1P a E_2P o incluso impide la formación de E_1P (Simon-Plas *et al.* 1996).

Un mecanismo de regulación de la ATPasa que se ha postulado y que puede estar involucrado en la inhibición o activación de esta enzima por moléculas como detergentes o toxinas microbianas, es la posible interacción de estas moléculas con el dominio hidrofílico autoinhibitorio del extremo carboxilo terminal, el cual al ser eliminado de la enzima por proteólisis controlada, activa a la enzima (Serrano, 1993). En el caso de toxinas fungales como la fusicocina, la cual activa permanentemente a la ATPasa, se pensaba que interactuaba directamente con la enzima, pero posteriormente se descubrió que la toxina hace contacto primero con un receptor, mismo que pertenecía a una familia de proteínas eucarióticas que están implicadas en varias funciones reguladoras: las proteínas 14-3-3. Este receptor se enlaza a la región reguladora del carboxilo terminal de la ATPasa y recientemente se ha descubierto que la secuencia a la cual se une contiene un residuo de fosfotreonina (Thr-948), el cual parece ser necesario para el enlace de la proteína 14-3-3; el papel de la fusicocina es estabilizar este enlace de forma irreversible (Olsson *et al.* 1998), sosteniendo así la activación de la ATPasa. No se podría descartar que la FB_1 pudiera tener una interacción directa con la región autoinhibitoria del carboxilo terminal o

6. DISCUSIÓN.

a través de otra proteína receptora que podría desencadenar una serie de reacciones, las cuales podrían llevar a la inhibición de la ATPasa (quizás a través de una fosforilación). Sin embargo, también se ha observado que algunas toxinas como la beticolina-1 no interactúan con la región reguladora del carboxilo terminal de la enzima y se sugiere que su interacción principal puede establecerse con las regiones hidrofóbicas (segmentos transmembranales) de la enzima y una vez que se producen los cambios conformacionales en la enzima como consecuencia de esta interacción, se podría hacer un rearrreglo de la región hidrofílica del carboxilo terminal (Gomès *et al.* 1996). Esto último también pudiera ser especialmente cierto para la FB₁, ya que en los estudios de resonancia del espín electrónico se observó que la FB₁ tiene efectos perturbadores principalmente sobre la parte superficial de las bicapas lipídicas, más que hacia la parte central, lo cual ha llevado a proponer que los grupos de ácidos tricarboxílicos de la FB₁ puedan estar interactuando con los grupos cabeza polares de los lípidos membranales y que la región del esqueleto hidrocarbonado semejante al de las bases esfingoideas interactúa con la regiones hidrofóbicas de la membrana. Ambas posibilidades podrían ser válidas en su interacción con la ATPasa, y su resultado sería la formación del complejo ESI durante la catálisis enzimática por un mecanismo que, como en el caso de la beticolina-1 podría involucrar la interrupción del ciclo catalítico de la enzima (Yin *et al.* 1996).

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES.

- 1) La fumonisina B₁ inhibe aproximadamente un 23-31% la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática, cuando la FB₁ se añade a vesículas de membrana plasmática aisladas.
- 2) La fumonisina B₁ inhibe aproximadamente un 24-43% la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática de vesículas de membrana plasmática de embriones que fueron expuestos a la fumonisina B₁.
- 3) El hecho de que se observe prácticamente el mismo efecto cuantitativo de la FB₁ en la ATPasa tanto en membranas aisladas como en embriones, sugiere que gran parte del efecto de la FB₁ sobre la ATPasa es directamente sobre la enzima. Pero no se puede descartar que simultáneamente exista un efecto de la FB₁ sobre la fase lipídica de la membrana.
- 4) En este trabajo se estableció que el efecto inhibitorio de la FB₁ sobre la actividad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es de tipo acompetitivo, con una K_i de 10.5 μM y una I₅₀ de 34 μM.

CONCLUSION GENERAL

La Fumonisinina B₁ altera una propiedad membranal como es la permeabilidad y modifica la actividad de una enzima membranal como es la ATPasa de membrana plasmática, lo cual sugiere que la FB₁ está interactuando con los componentes de la membrana plasmática tanto lipídicos como proteicos. El patrón de inhibición de la ATPasa de H⁺ por la FB₁ y el bajo valor de K_i sugieren que un mecanismo de acción de la FB₁ es a través de una interacción directa con la enzima.

El efecto de la FB₁ sobre la ATPasa puede contribuir a la fisiología de la interacción entre la planta y el patógeno.

8. BIBLIOGRAFIA.

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

Abbas, H. K., Tanaka T., Duke O. S., Porter J. K., Wray E. M., Hodges L., Sessions A. E., Wang E., Merrill H. A., Jr. y Riley R. T. 1994. Fumonisin- and AAL-Toxin Induced Disruption of sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Plant Physiol.* 106: 1085-1093.

Becker D., Zeilinger C., Lohse G., Depta H., Hedrich R. 1993. Identification and biochemical characterization of the plasma membrane H^+ -ATPase in guard cell of *Vicia faba* L. *Planta* 189: 44-50.

Bidway A. P., Zhang L., Bachmann R. C. y Takemoto J. Y. 1987. Mechanism of action of *Pseudomonas syringae* phytotoxin syringomycin. Stimulation of red beet plasma-membrane ATPase activity. *Plant Physiol.* 83: 39-43.

Blackwell B. A., Edwards O. E., Fruchier A., ApSimon J. W. y Miller J. D. 1996. NMR estructural studies of fumonisin B_1 and related compounds from *Fusarium* Moniliforme. En: Fumonisin in food. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol. 392 (Jackson L. S., DeVries J. W. y Bullerman L. B. eds.). Plenum Press. New York. pp. 75-91.

Brauer D, Tu S-I., Hsu A-F., Thomas C. E. 1989. Kinetic analysis of proton transport by the vanadate-sensitive ATPase from maize root microsomes. *Plant Physiol.* 89:464-471.

Briskin D. P. y Hanson J. B. 1992. How does the plant plasma-membrane H^+ -ATPase pump protons?. *J. Exp. Bot.* 43: 269-289.

Bullerman L. B. 1996. Ocurrance of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. En: Fumonisin in food. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol. 392 (Jackson L. S., DeVries J. W. y Bullerman L. B. eds.). Plenum Press. New York. pp. 27-38.

Bushnell W. R. y Rowell J. B. 1981. Suppressors of defense reactions: A model for roles in specificity. *Phytopathology* 71: 1012-1014.

Chang H-C. y Bush D. R. 1997. Topology of NAT2, a prototypical example of a new family of aminoacid transporters. *J. Biol. Chem.* 272: 30552-30557.

Chen L. y Bush D. R. 1997. LHT1, a lysine- and histidine- specific aminoacid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 115: 1127-1134.

Clarkson J. M. 1992. Fungi. En: *Molecular Plant Pathology. A practical Approach.* Vol. I. (Gurr, S. J., McPherson y Bowles D. J. Eds.). Oxford University Press. Oxford. pp. 67-77.

De Michaelis M. I. y Spanswick R. M. 1986. H^+ -pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol.* 81: 542-547.

De Michaelis M. I., Rasi-Caldogno F., Pugliarello M. C. y Olivari C. 1996. Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H^+ -ATPase. III Is there a direct interaction between the fusicoccin receptor and the plasma membrane H^+ -ATPase?. *Plant Physiol.* 110: 957-964.

Desjardins A. E., Plattner R. D., Nelsen T. C. y Leslie J. F. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium*

8. BIBLIOGRAFÍA

moniliforme) on maize (*Zea mays*) seedlings. Appl. Environ. Microbiol. 61: 79-86.

Doehlert D. C., Clarence A. K. y Vesonder R. F. 1994. Phytotoxic effects of fumonisin B₁ on maize seedling growth. Mycopathologia 127: 117-121.

Dupont F. M., Burke L. L. y Spanswick R. M. 1981. Characterization of a Partially Purified Adenosine Triphosphatase from a Corn Root Plasma Membrane Fraction. Plant Physiol. 67: 59-63.

Fukuda H., Shima H., Vesonder R. F., Tokuda H., Nishino H., Katoh S., Tamura S., Sugimura T. y Nagao M. 1996. Inhibition of Protein Serine/Threonine Phosphatases by Fumonisin B₁, a Mycotoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 220:160-165.

Gallagher S. R. y Leonard R. T. 1982. Effect of Vanadate, Molybdate, and Azide on Membrane-Associated ATPase and Soluble Phosphatase Activities of Corn Roots. Plant Physiol. 70: 1335-1340.

Gomès E., Gordon-Weeks R., Simon-Pias F., Pugin A., Milat M-L., Leigh R. A. y Blein J-P. 1996. *Cercospora beticola* toxins. Part XVII. The role of the beticolin/Mg²⁺ complexes in their biological activity. Study of plasma membrane H⁺-ATPase, vacuolar H⁺-PPase, alkaline and acid phosphatases. Biochim. Biophys. Acta 1285: 38-46.

González-Romo P., Sánchez-Nieto S. y Gavilanes-Ruiz M. 1992. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration. Anal. Biochem. 200: 235-238.

Goudet C., Véry A-A., Milat M-L., Ildefonse M., Thibaud J-B., Sentenac H. y Blein J-P. 1998. Magnesium ions promote assembly of channel-like structures from beticolin 0, a non-peptide fungal toxin purified from *Cercospora beticola*. The Plant J. 14: 359-364.

Hager A. y Biber W. 1984. Functional and regulatory properties of H⁺ pumps at the tonoplast and plasma membranes of *Zea mays* coleoptiles. Z. Naturforsch 39: 927-937.

Hager A., Debus G., Edel H-G., Stransky H. y Serrano R. 1991. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma membrane H⁺-ATPase. Planta 185: 527-537.

Isaac S. 1992. Fungal-plant interactions. Ed. Chapman and Hall. Londres. pp. 418.

Kato, T., Shiraiishi, T., Toyoda, K., Saitoh, K., Satoh, Y., Tahara, M., Yamada, T. y Oku, H. 1993. Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes by fungal suppressors from *Mycosphaerella pinodes* and their peptide moieties. Plant Cell Physiol. 34: 439-445.

Kauss H. 1990. Role of the plasma membrane in host-pathogen interactions. En: The plant plasma membrane. (Larsson C. y Møller I. M. eds.). De. Springer-Verlag. Berlín. pags. 320-350.

Keen N. T. 1986. Specific recognition in gene-for-gene host-parasite systems. Adv. Plant Pathol. 1: 35-82.

Knogge W. 1996. Fungal Infection of Plants. The Plant Cell 8: 1711-1722.

Larsson C., Møller I. M. y Widell S. 1990. Introduction to the plant plasma membrane - Its molecular composition and organization. En: The Plant Plasma Membrane (Larsson, C. y Møller, I. M. eds.). Ed. Springer-Verlag. Berlín. pags. 1- 15.

Larsson C., Sommarin M. y Widell S. 1994. Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles. Methods Enzymol. 228: 451-469.

8. BIBLIOGRAFÍA

Leegood R. C. y Scholes J. D. 1992. Metabolic changes following infection leaves fungi and viruses. En: *Molecular Plant Pathology. A practical Approach*. Vol. II. (Gurr, S. J., McPherson y Bowles D. J. Eds.). Oxford University Press. Oxford. pp 223-232.

Manners J. G. 1982. *Principles of plant pathology*. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 264.

Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. 1993. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. pp. 1013.

Marasas W. F. O. 1985. *Fusarium Moniliforme: A micotoxicological miasma*. En: *Developments in food Science*. Vol. 7. (Kurata, H. y Ueno Y. eds.) Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam. pp. 19-28.

Marasas W. F. O. 1996. Fumonisin: History, World-Wide Occurrence and Impact. En: *Fumonisin in food. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 392. (Jackson L. S., DeVries J. W. y Bullerman L. B. eds.). Plenum Press. New York. pp. 1-17

Merrill A. H., Echten G. v., Wang E. y Sandhoff K. 1993. Fumonisin B₁ inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in culture neurons *in situ*. *J. Biol. Chem.* 268(36): 27299-27306.

Michelet B. y Boutry M. 1995. The Plasma Membrane H⁺-ATPase. A Highly Regulated Enzyme with Multiple Physiological Functions. *Plant Physiol.* 108:1-6.

Michelet B. y Boutry M. 1996. Proton-translocating ATPases of the plasma membrane: biological functions, biochemistry and molecular genetics. En: *Membranes: specialized functions in plants*. (Smallwood M., Knox J. P. y Bowles D. J. eds.) Ed. BIOS Scientific Publishers. Oxford, UK. pp. 261-279.

Michelet B., Pérez C., Goffeau A. y Boutry M. 1989. The plasma membrane H⁺-ATPase of *Nicotiana plumbaginifolia*. En: *Plant membrane transport: the current position*. (Dainty J. De Michaelis M. I., Marré E. y Rasi-Caldogno F. eds.). Amsterdam: Elsevier Science Publisher. pp. 455-460.

Neergaard, P. 1977. *Seed pathology*. Vol. 1. John Wiley & Sons.

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

Olsson A., Svennelid F., Ek B., Sommarin M. y Larsson C. 1998. A phosphothreonine residue at the C-terminal end of the plasma membrane H⁺-ATPase is protected by fusicoccin-induced 14-3-3 binding. *Plant Physiol.* 118: 551-555.

O'Neill S. D. y Spanswick R. M. 1984. Effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn. *Plant Physiol.* 75: 586-591.

O'Sullivan W. J. y Smitters G. W. 1979. Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. *Methods Enzymol.* 63: 294-336.

Palmgren M.G. y Christensen G. 1993. Complementation *in situ* of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase gene *pma1* by an H⁺-ATPase gene from a heterologous species. *FEBS Lett.* 317: 216-222.

Palmgren M. G., Larsson C., Sommarin M. 1990a. Proteolytic activation of plasma membrane H⁺-ATPase by removal of a terminal segment. *J. Biol. Chem.* 265: 13423-13426.

Palmgren M. G. y Sommarin M. 1989. Lysophosphatidylcholine stimulates ATP dependent accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* 90:

8. BIBLIOGRAFÍA

1009-1014.

Palmgren M. G., Sommarin M., Serrano R. y Larsson C. 1991. Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 266: 20470-20475.

Palmgren M. G., Sommarin M., Ulvskov P. y Larsson C. 1990b. Effect of detergents on the H⁺-ATPase activity of inside-out and right-side-out plant plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1021: 133-140.

Pandol S. J., Schoeffield-Payne M. S., Gukovskaya A. S. y Rutherford R. E. 1994. Sphingosine regulates Ca²⁺-ATPase and reloading of intracellular Ca²⁺ stores in the pancreatic acinar cell. *Biochim. Biophys. Acta* 1195: 45-50.

Parets-Soler A., Pardo J. M. y Serrano R. 1990. Immunocytolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 93: 1654-1658.

Pegg G. F. 1984. En: *Plant diseases: infection, damage and loss* (Wood, R.K.S. y Jellis, G. J. Eds.). Blackwell, Oxford. p. 29.

Perlin D. S. y Spanswick R. M. 1981. Characterization of ATPase Activity Associated with Corn Leaf Plasma Membranes. *Plant Physiol.* 68: 521-526.

Peterson G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* Which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356.

Rasi-Caldogno F. y Pugliarello M. C. 1985. Fusicoccin stimulates the H⁺-ATPase of plasmalemma in isolated membrane vesicles from radish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 280-285.

Rasi-Caldogno F., Pugliarello M. C., Olivari C. y De Michelis M. I. 1993. Controlled proteolysis mimics the effect of fusicoccin on the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 103: 391-398.

Rayle D. L. y Cleland R. 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99: 1271-1274.

Rochester C.P., Kjellbom P. y Larsson C. 1987. Lipid composition of plasma membrane from barley leaves and roots, spinach leaves and cauliflower inflorescences. *Physiol. Plant.* 71:257-263.

Sánchez-Nieto S., García-Rubio O., Pacheco-Moisés F., Carballo A., Rodríguez-Sotres R. y Gavilanes-Ruiz M. 1997. Purification of plasma membranes from dry maize embryos. *Physiol. Plant.* 101: 157-164.

Sauer N., Kerstin B., Gahrz M., Stadler R., Stolz J. y Truernit E. 1994. Sugar transport across the plasma membranes of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 26: 1671-1679.

Schaller G. E. y Susman M. R. 1988. Phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase of oat roots by a calcium-stimulated protein kinase. *Planta* 173:509-518.

Serrano R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94.

Serrano R. 1993. Structure, function and regulation of plasma membrane H⁺-ATPase. *FEBS* 325: 108-111.

Shiraishi T., Araki M., Yoshioka H., Kobayashi I., Yamada T., Ichinose Y., Kumoh H. y Oku H. 1991a. Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes in situ by a suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 32: 1067-1075.

Shiraishi T., Yamada T., Oku H. y Yoshioka H. 1991b. Suppressor production as a

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

8. BIBLIOGRAFÍA

key factor for fungal pathogenesis. In *Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants*. (Patil, S. S., Ouchi, S., Mills D., y Vance C. Eds.). Springer-Verlag. New York. pp. 151-162.

Simon E. W. 1984. Early events in germination. En: *Seed physiology*. Vol. 2. (Murray, D. ed.). Academic Press Australia. Australia. pp. 77-112.

Simon E. W. y Raja-Harun R. M. 1972. Leakage during seed imbibition. *J. Exp. Bot.* 23: 1076-1085.

Simon-Plas F., Gomès E., Milat M. L., Pugin A. y Blein J. P. 1996. *Cercospora beticola* toxins. X. Inhibition of plasma membrane H^+ -ATPase by beticolin-1. *Plant Physiol.* 111: 773-779.

Somssich I. E. y Hahlbrock K. 1998. Pathogen defence in plants -a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3(3): 86-90.

Susuki Y. S., Wang Y. y Takemoto J. Y. 1992. Syringomycin-stimulated phosphorylation of the plasma membrane H^+ -ATPase from red beet storage tissue. *Plant Physiol.* 99: 1314-1320.

Thiel P.G., Marasas W. F. O., Sydenham E. W., Shephard G. S., Gelderblom W. C. A. y Nieuwenhuis J.J. 1991. Survey of Fumonisin production by *Fusarium* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1089-1093.

Van Asch M. A. J., Rijkenberg F. H. J. y Coutinho T. A. 1992. Phytotoxic of fumonisin B₁, moniliformin and T-2 toxin to corn callus cultures. *Phytopathology* 82: 1330-1332.

Vera-Estrella R., Barkla B. J., Higgins V. J. y Blumwald E. 1994. Plant defense response to fungal pathogens. Activation of host-plasma membrane H^+ -ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol.* 104: 209-215.

Wach A., Schlessner A. y Goffeau A. 1992. An alignment of 17 deduced protein sequences from plant, fungi and protozoa H^+ -ATPase genes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 309-317.

Walton J. D. 1997. *Biochemical Plant Pathology*. En: *Plant Biochemistry* (Dey, P. M. y Harborne, J. B. eds.). Academic Press, Gran Bretaña. pp. 487-502.

Wang E., Norred W. P., Bacon C. W., Riley R. T. y Merrill A. H. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with fusarium moniliforme. *J. Biol. Chem.* 266 (22): 14486-14490.

Wevelsiep L., Ripping E. y Knogge W. 1993. Stimulation of barley plasmalemma H^+ -ATPase by phytotoxic peptides from the fungal pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Plant Physiol.* 101: 297-301.

Xing T., Higgins V. J. y Blumwald E. 1996. Regulation of Plant Defense Response to Fungal Pathogens: Two Types of Protein Kinases in the Reversible Phosphorylation of the Host Plasma Membrane H^+ -ATPase. *The Plant Cell* 8: 555-564

Yin J-J., Smith M. J., Eppley R. M., Troy A. L., Page S. W. y Sphon J. A. 1996. Effects of fumonisin B₁ and (hydrolyzed) fumonisin backbone AP₁ on membranes: a spin-label study. *Arch. Biochem. Biophys.* 335: 13-22.

Yin J-J., Smith M. J., Eppley R. M., Page S. W. y Sphon J. A. 1998. Effects of fumonisin B₁ on lipid peroxidation in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1371: 134-142.