



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LA FUMONISINA B<sub>1</sub> Y  
COMPUESTOS ESFINGOIDEOS EN LA  
ACTIVIDAD DE MAP CINASAS EN EMBRIONES  
DE MAÍZ”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

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

**MARIANA SAUCEDO GARCÍA**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**MÉXICO, D. F.**

**2004**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Jurado asignado:

Presidente:	Homero Hernández Montes
Vocal:	Marina Gavilanes Ruíz
Secretario:	Rogelio Rodríguez Sotres
1er. suplente	José Pedraza Chaverri
2do. suplente	Ma. Elena Ibarra Rubio

Lugar donde se desarrolló el tema:


Lab. 101 Depto. de Bioquímica,  
Facultad de Química, UNAM



Asesor

Marina Gavilanes Ruíz

Supervisor técnico



Laura Carrón Salazar

Sustentante

Mariana S.G.  
Mariana Saucedo García

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Mariana Saucedo

García

FECHA: 12 / Abril / 04

FIRMA: Mariana S.G.

## DEDICATORIAS

A mi mamá y papá por su apoyo incondicional aún en mis decisiones equivocadas, que considero son innumerables; su amor; su dedicación; su tiempo. A ustedes TODO.

A mis hermanas: Gaby, Renata, Aurora, por todas las experiencias compartidas.

A mi "hermanita menor" cuya personalidad admiro.

A mi abuelita Esperanza por haber sensibilizado hasta lo más profundo de mi ser. Te extraño.

A mamá Aurora por su carácter, que finalmente compartimos.

A mis primos y tíos por conformar una hermosa familia.

A los Alebrijes y globalifóbicos; principalmente a los personajes que lo conforman: "el líder", Gaby, Norma, Paris, Ana, Dessire, Luz, Víctor U., Víctor G, Liliana, David.

A Bety, Bere, Hiralda, Refugio y Diana por haber amenizado mi estancia en la Facultad y por ser unas excelentes amigas.

A Paco-chango, Toño, Beto, Mario, Paco V. y Tavo fosforilado por saberme escuchar.

A Renato, por ayudarme a redescubrir mi esencia y a valorar la vida.

A los integrantes del Lab. 101 por todo su apoyo durante mi estancia en el laboratorio; y por sus comentarios, observaciones y críticas que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. F. Javier Plasencia de la Parra y a la Dra. Marina Gavilanes Ruíz por ser unos excelentes asesores y por demostrar en su vida diaria y como investigadores esa sensibilidad humana que los caracteriza.

## RECONOCIMIENTOS:

Este trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección de la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, en el laboratorio 101 del Dpto. de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, y bajo la supervisión técnica de la Q. F. B. Laura Carmona Salazar.

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

Se agradece a los Dres. Marina Gavilanes Ruíz, Rogelio Rodríguez Sotres y Homero Hernández Montes por la revisión y correcciones de la presente tesis.

Mariana Saucedo García realizó esta tesis gracias al proyecto del Subprograma 127 "Formación Básica en Investigación" (Coordinación de Superación Académica) de la Facultad de Química.

Este trabajo fue financiado por el proyecto DGAPA, UNAM (IN208300), CONACYT (40311-Q). El material está basado en trabajo apoyado por un donativo del Instituto para México y Estados Unidos de la Universidad de California (UCMEXUS), y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT).

# ÍNDICE

Lista de Figuras	_____v
Lista de Tablas	_____vi
Lista de Abreviaturas	_____vii
1. RESUMEN	_____1
2. INTRODUCCIÓN	_____3
2.1 Interacción planta-patógeno	_____3
2.2. Mecanismos de resistencia en plantas	_____5
2.2.1. Generación de Especies Reactivas de Oxígeno: primeras respuestas de defensa	_____5
2.2.2. Respuesta de Hipersensibilidad: muerte celular programada que previene la propagación del patógeno	_____6
2.2.3. Fortalecimiento de la pared celular	_____7
2.2.4. Lipooxigenasas	_____8
2.2.5. Fitoalexinas	_____8
2.2.6. Metabolitos secundarios: defensas preformadas	_____8
2.3. Metabolitos secundarios fúngicos en la invasión de plantas	_____9
2.3.1. Evocadores y supresores: Factores determinantes en la invasión del patógeno	_____9
2.3.2. Deterioro de las funciones de la planta por toxinas fúngicas	_____10
2.3.2.1. Fumonisinias	_____11
2.3.2.1.1. Fumonisina B <sub>1</sub> : inhibidor de la biosíntesis de esfingolípidos	_____11
2.3.2.1.2. Generalidades de los esfingolípidos	_____13
2.4. Mecanismos de respuesta de la planta a patógenos	_____15
2.4.1. Peróxido de hidrógeno	_____15
2.4.2. Óxido nítrico	_____16
2.4.3. Hormonas	_____16
2.4.3.1. Ácido salicílico	_____16
2.4.3.2. Etileno	_____17
2.4.3.3. Ácido abscísico	_____17
2.4.4. Proteínas R	_____18

2.4.5. Proteínas G heterotriméricas	18
2.4.6. Proteínas G pequeñas	19
2.4.7. Cinasas de proteína: mecanismos básicos de regulación	19
2.4.7.1. Grupo AGC	21
2.4.7.2. Grupo de las CaMK	21
2.4.7.3. Grupo de las cinasas CMGC	21
2.4.7.4. Cinasas de proteína PTK	22
2.4.7.5. Cinasas de proteína receptoras	22
2.5. MAP cinasas: receptores específicos durante la señalización en plantas	22
2.5.1. Generalidades de las cascadas de MAP cinasas	22
2.5.2. Conformación de la cascada de MAP cinasas	23
2.5.2.1. MAPKKKs	24
2.5.2.2. MAPKKs	25
2.5.2.3. MAPKs	27
2.5.3. Las MAP cinasas y su participación en respuesta a estímulos externos	29
2.5.3.1. MAP cinasas y estimulación mecánica	29
2.5.3.2. MAP cinasas y señalización causada por lesiones	29
2.5.3.3. MAP cinasas y estimulación oxidativa	31
2.5.3.4. MAP cinasas y estimulación osmótica	31
2.5.3.5. El papel de las cascadas de MAP cinasas en la señalización hormonal de las plantas	32
2.5.3.6. MAP cinasas y respuesta a patógenos	32
2.5.4. Inhibición de la cascada de MAP cinasas	32
3. ANTECEDENTES INMEDIATOS	35
4. HIPÓTESIS	37
5. OBJETIVOS	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1. Material biológico	38
6.2. Imbibición de embriones de maíz con FB <sub>1</sub> , SN, PS o CE	38
6.3. Extracción de la fracción citosólica	38
6.4. Cuantificación de proteína	38



6.5. Ensayo en solución para determinar actividad de cinasas de MBP	40
6.5.1. Ensayos de estandarización de fosforilación de la MBP	40
6.5.2. Fosforilación de la MBP por los extractos citosólicos expuestos a la FB <sub>1</sub> y compuestos esfingoides (ensayo <i>in vitro</i> )	42
6.5.2.1. Efecto del tiempo de exposición sobre la actividad de cinasas de MBP	42
6.5.2.2. Efecto de la concentración de la FB <sub>1</sub> y compuestos esfingoides sobre la actividad de cinasas de MBP	43
6.5.3 Fosforilación de la MBP por efecto de la exposición <i>in vivo</i> de la FB <sub>1</sub> y compuestos esfingoides	43
6.5.3.1. Comparación de los efectos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la FB <sub>1</sub> y los compuestos esfingoides en la fosforilación de la MBP	43
6.5.4. Efecto de los inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP expuestas a la FB <sub>1</sub> y compuestos esfingoides	44
6.5.4.1. Efecto de dos mezclas diferentes de inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP de las FCs expuestas a FB <sub>1</sub> o compuestos esfingoides	44
6.5.4.2. Efecto de dos mezclas diferentes de inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP de las FCs expuestas a PS o CE	44
7. RESULTADOS	
7.1. Cuantificación de proteínas	46
7.2. Separación electroforética de las proteínas de las FCs de embriones de maíz	47
7.3. Optimización de condiciones de fosforilación de la MBP	48
7.3.1. Relación MBP/FC óptima para las reacciones de fosforilación	48
7.3.2. Efecto de la dilución isotópica de [ $\gamma$ <sup>32</sup> P-ATP] con ATP sin marcaje radioactivo	48
7.3.3. Actividad de cinasa presente en FCs de embriones de maíz en germinación	50
7.4. Efecto del tiempo de exposición <i>in vitro</i> de los compuestos esfingoides o la FB <sub>1</sub> en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz	51
7.5. Efecto de la concentración de la FB <sub>1</sub> o compuestos esfingoides sobre la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz	53
7.6. Comparación de la fosforilación de la MBP <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	55

7.7. Efecto de los inhibidores de fosfatasas en el nivel de fosforilación de la MBP de FCs expuestas <i>in vitro</i> a la FB <sub>1</sub> o compuestos esfingoideos	60
8. DISCUSIÓN	
8.1. Definición de los parámetros óptimos de fosforilación de la MBP	64
8.2. Actividad de cinasa presente en FCs de embriones de maíz en germinación	65
8.3. Efecto en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos <i>in vitro</i> a la FB <sub>1</sub> o a los compuestos esfingoideos	66
8.4. Efecto en la actividad de MAP cinasas de embriones de maíz expuestos <i>in vivo</i> a la FB <sub>1</sub> o a los compuestos esfingoideos	69
8.5. La actividad de cinasas de MBP es regulada por fosfatasas	71
9. CONCLUSIONES	76
10. BIBLIOGRAFÍA	77

## LISTA DE FIGURAS

1. Escenificación de los diferentes tipos de interacción planta-patógeno que ocurren durante la invasión de hongos y bacterias en plantas	_____ 4
2. Estructuras químicas de la toxina fúngica FB <sub>1</sub> y de las bases esfingoideas predominantes en plantas: esfingina y fitoesfingosina	_____ 12
3. Ruta de la biosíntesis de novo de esfingolípidos en plantas que muestra a las enzimas participantes durante el proceso	_____ 14
4. Esquema que simplifica el funcionamiento de las cascadas de MAP cinasas	_____ 25
5. Árbol filogenético y propiedades de las posibles proteínas cinasas cinasas cinasas activadas por mitógenos (MAPKKK)	_____ 26
6. Árbol filogenético y propiedades de las proteínas cinasas cinasas activadas por mitógenos (MAPKK)	_____ 27
7. Árbol filogenético y propiedades de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)	_____ 28
8. Electroforesis de proteínas de referencia preteñidas en un gel desnaturizante y la respectiva relación entre movilidad relativa y peso molecular de las proteínas	_____ 47
9. Efecto de la variación de la relación MBP/FC sobre el nivel de fosforilación del sustrato de las cinasas de MBP de embriones de maíz	_____ 49
10. Efecto de la dilución isotópica de [ $\gamma$ <sup>32</sup> P-ATP] con ATP sin marcaje radioactivo	_____ 50
11. Actividad de cinasa presente en FCs de embriones de maíz en germinación	_____ 51
12. Efecto del tiempo de exposición <i>in vitro</i> de la FB <sub>1</sub> y de los compuestos esfingoideos en la actividad de cinasas de embriones de maíz	_____ 54
13. Efecto de la concentración de la FB <sub>1</sub> y de los compuestos esfingoideos en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz	_____ 57
14. Efecto de la exposición de embriones de maíz <i>in vivo</i> o <i>in vitro</i> a 10 $\mu$ M de FB <sub>1</sub> o compuestos esfingoideos en la actividad de cinasas de MBP	_____ 58
15. Efecto de la exposición de embriones de maíz <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> con la FB <sub>1</sub> o compuestos esfingoideos en la actividad de cinasas de MBP	_____ 59
16. Efecto de los inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP de FCs de embriones de maíz expuestas <i>in vitro</i> a FB <sub>1</sub> o compuestos esfingoideos	_____ 62
17. Efecto de los inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP de FCs de embriones de maíz expuestas <i>in vitro</i> a PS y CE	_____ 63

## LISTA DE TABLAS

1. Evidencias de la participación de MAP cinasas en la transducción de señales en plantas	_____30
2. MAPKs inducidas durante la infección de plantas con patógenos	_____33
3. Composición del Buffer de Fosforilación para el ensayo de fosforilación de la MBP	_____40
4. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación para el ensayo con diferentes relaciones FC/MBP	_____41
5. Composición del Buffer de Fosforilación para el ensayo con diferentes concentraciones de ATP	_____41
6. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación para el ensayo de la Tabla 5	_____41
7. Composición del Buffer de Fosforilación para caseína, histona o MBP	_____42
8. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación para el ensayo de la Tabla 7	_____42
9. Composición del Buffer de Fosforilación de MBP en presencia de compuestos esfingoides	_____42
10. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación para el ensayo de la Tabla 9	_____42
11. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación de MBP en presencia de diferentes concentraciones de compuestos esfingoides	_____43
12. Composición de la mezcla general de la reacción de fosforilación de MBP efectuada por las FCs expuestas <i>in vivo</i> a los compuestos esfingoides durante 6 o 24 horas	_____43
13. Composición de las mezclas de inhibidores de fosfatasas.	_____44
14. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación de MBP en presencia de compuestos esfingoides e inhibidores de fosfatasas	_____44
15. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación de MBP en presencia de PS o CE e inhibidores de fosfatasas	_____45
16. Comparación entre diferentes procedimientos de cuantificación de proteínas de las FCs	_____47

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AP1	Aminopentol
Avr	Avirulento
CaMK	Cinasas de proteína dependientes de calcio/calmodulina
CDKs	Cinasas dependientes de ciclina
CDPK	Cinasas de proteína con dominio como calmodulina
CE	Ceramida
DsPTPasas	Fosfatasa con doble especificidad
ET	Etileno
FB <sub>1</sub>	Fumonisina B <sub>1</sub>
FC	Fracción citosólica
GmSIPK	<i>Glycine max</i> SIPK
GPCR	Receptores acoplados a las proteínas G
GST	Glutación S-transferasa
HFB	Fumonisina completamente hidrolizada
HR	Respuesta de Hipersensibilidad
HRPG	Glicoproteína básica rica en hidroxiprolina
JA	Ácido jasmónico
LOX	Lipooxigenasa
LRR	Repetición rica en leucina
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MAPKK	Proteína cinasa cinasa activada por mitógeno
MAPKKK	Proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógeno
MBP	Proteína Básica de Mielina
NB-LRR	Repeticiones ricas en leucina con sitio de unión a nucleótidos
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
PAL	Fenilalanina amonio-liasa
PAK	Cinasa de proteína p21 <sup>ras</sup> -activada
PCD	Muerte celular programada
PERK	Cinasas-1 receptoras extensas en prolina
PG	Poligalacturonasa
PH	Homología Pelckstrin
PIN	Inhibidores de proteasas
PKA y PKG	Cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos
PKC	Cinasas dependientes de calcio-fosfolípidos

PR	Proteínas que responden a patógenos
PS	Fitoesfingosina
PTK	Cinasas de proteína de tirosina
PTPasas	Fosfatasa de tirosina
R	Resistencia
RLK	Cinasas de proteína receptoras
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SAMK	MAPK activada por estrés
SAR	Respuesta sistémica adquirida
SIMK	Proteína cinasa inducida por sal
SIPK	Proteína cinasa inducida por SA
SN	Esfinganina
SOD	Superóxido dismutasa
WIPK	Proteína cinasa inducida por heridas

## 1. RESUMEN

---

---

Las plantas resistentes al ataque de patógenos desencadenan una serie de reacciones que inducen respuestas de defensa de forma casi inmediata. Algunas de estas reacciones requieren de cascadas de señalización para activar la defensa. Las cascadas de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAP cinasas) son módulos universales de señalización localizadas en las células eucarióticas y están compuestas por tres miembros (MAPKKKs, MAPKKs y MAPKs) las cuales perciben, amplifican y transducen los estímulos del medio ambiente o de otros organismos para activar los mecanismos de defensa que permitan la supervivencia de la célula.

*Fusarium verticillioides*, un patógeno natural del maíz (*Zea mays*) secreta toxinas que interrumpen los procesos fisiológicos de la planta que lo hospeda. El grupo de micotoxinas que secreta este hongo se denominan fumonisinas y poseen estructuras análogas a las bases esfingoideas, que son los precursores de los esfingolípidos complejos presentes en membranas plasmáticas. La fumonisina predominante en este grupo de micotoxinas es la FB<sub>1</sub>, la cual interrumpe la biosíntesis de los esfingolípidos de las células hospederas, acumulando bases esfingoideas y disminuyendo los niveles endógenos de ceramida.

En este trabajo se desarrolló una técnica en solución para detectar la actividad de MAP cinasas y otras cinasas cuyo sustrato *in vitro* es la proteína básica de la mielina (MBP) para identificar los efectos de la FB<sub>1</sub> y de los compuestos esfingoideos esfinganina (SN), fitoesfingosina (PS) y ceramida (CE) en la actividad de estas cinasas de proteína. Para ello fue necesario primero establecer las condiciones óptimas de fosforilación de la MBP que actúa como sustrato específico de las MAP cinasas y posiblemente de otras cinasas.

Una vez establecidas las condiciones para la detección de la fosforilación de la proteína sustrato, se determinó el efecto de la adición *in vitro* e *in vivo* de la FB<sub>1</sub> y de los compuestos esfingoideos en la actividad de las cinasas de proteína a partir de fracciones citosólicas de embriones de maíz. La exposición *in vitro* se refiere a la adición directa de los compuestos en estudio a las FCs obtenidas de embriones de maíz y la exposición *in vivo* a la adición de los compuestos a los embriones de maíz de manera previa a la imbibición.

La exposición *in vitro* de las FCs expuestas a la FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoideos resultó en una inhibición de las cinasas de MBP con diferentes cinéticas. La FB<sub>1</sub> y la SN produjeron una inhibición de cinasas con cinéticas similares para los diferentes tipos de experimentos

(tiempo de imbibición y diferentes concentraciones de los compuestos), mientras que la PS y CE a las mismas concentraciones produjeron una mayor y consistente inhibición de las cinasas de MBP.

Considerando los resultados anteriores se evaluaron diferentes inhibidores de fosfatasas para determinar si eran las fosfatasas de proteína quienes estaban regulando la actividad de las cinasas de MBP. Los resultados de estos experimentos indicaron que las fosfatasas de proteína fueron las responsables de la defosforilación de la MBP y que su actividad se incrementó en presencia de PS y CE.

Por otro lado, se compararon los efectos de la exposición *in vivo* e *in vitro* de las FCs a la FB<sub>1</sub> y a los compuestos esfingoideos de embriones de maíz embebidos durante 6 y 24 horas. De forma contraria a la exposición *in vitro*, la exposición *in vivo* de los embriones de maíz a FB<sub>1</sub> y SN produjo una discreta activación de cinasas de MBP. La máxima actividad de las cinasas de MBP se presentó por efecto de la FB<sub>1</sub> a las 6 horas de imbibición mientras que a las 24 horas fue la SN, la responsable de activar en mayor magnitud a las cinasas de MBP.

Estos resultados indican que el efecto de la FB<sub>1</sub> en la actividad de las cinasas de MBP puede ser el resultado neto del efecto de la toxina *per se*, pero también del aumento en los niveles endógenos de SN y PS reportada previamente en embriones de maíz, ya que estos compuestos esfingoideos son capaces de inducir la actividad de cinasas y fosfatasas de MBP en los embriones en germinación. Los resultados sugieren que las MAP cinasas pueden ser una o las cinasas responsables de la fosforilación de MBP en este sistema experimental.



## 2. INTRODUCCIÓN

---

### 2.1. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Las relaciones planta-patógeno han tenido una enorme importancia en el desarrollo de la civilización, desde que los seres humanos comenzaron a depender de manera extensiva de las plantas cultivadas para su alimentación (Anaya, 2003).

La mayoría de las plantas permanecen sanas durante su ciclo vital y cuando presentan alguna enfermedad, ésta generalmente se restringe a pequeñas partes del tejido. La enfermedad es resultado de una infección exitosa que lleva a la muerte sólo extraordinariamente, ya que las plantas han desarrollado defensas constitutivas e inducidas que detienen o previenen el ataque de bacterias, hongos, virus, invertebrados y otras especies de plantas (Buchanan *et al.*, 2000).

A su vez, cada patógeno invade a la planta a través de mecanismos específicos: algunas especies penetran directamente en la superficie ejerciendo presiones mecánicas o bien atacando enzimáticamente; otras logran hacerlo a través de aperturas naturales como son los estomas o las lenticelas; y finalmente se encuentran las especies que invaden tejidos que han sido lesionados previamente. Una vez establecido en la planta hospedera, el patógeno implementa estrategias de ataque que tienen como objetivo utilizar a la misma planta como sustrato (Buchanan *et al.*, 2000).

La especificidad de las relaciones planta-patógeno está determinada por mecanismos de reconocimiento a través de señales moleculares. Estas señales inducen una respuesta fisiológica necesaria en el patógeno para que la interacción se lleve a cabo o, contrariamente, inducen la expresión de genes de defensa en la planta hospedera para prevenir la invasión del patógeno.

La planta hospedera reconoce al patógeno mediante una interacción "gen por gen", en la que algún(os) producto(s) derivado(s) del(os) gen(es) de resistencia (*R*) de la planta hospedera reconoce(n) al o los productos específicos derivados del(os) gen(es) de avirulencia (*avr*) del patógeno. En general, las proteínas de resistencia (*R*) de la planta hospedera son las que reconocen a los productos avirulentos del patógeno y son estructuralmente similares, tanto en especies monocotiledóneas, como en dicotiledóneas; por lo que, se ha planteado que los mecanismos de reconocimiento y señalización de la defensa se han mantenido en el curso de la evolución y en la diversificación en plantas (Hammond-Kosack y Parker, 2003).

Las interacciones planta-patógeno se han clasificado en dos grupos principalmente: las compatibles y las incompatibles (Fig. 1). La interacción compatible ocurre cuando un factor avirulento (Avr) se interna en una planta hospedera susceptible, por lo que el crecimiento y desarrollo del patógeno se ven favorecidos. Durante la infección, el factor Avr del patógeno se une al blanco de virulencia de la planta susceptible y lo modifica; siendo estas alteraciones las que determinan el éxito o fracaso de la avirulencia del patógeno y la susceptibilidad de la planta hospedera (Hammond-Kosack y Parker, 2003). En este tipo de interacción, la planta hospedera no contiene a la proteína R, de tal manera que la proteína avirulenta del patógeno podría estar interfiriendo con un regulador positivo de la defensa de la planta, o bien, promoviendo a un supresor de la defensa (Staskawicz *et al.*, 2001; Bonas y Lahaye, 2002). La interacción incompatible está dada por plantas hospederas resistentes y ocurre por lo menos de dos maneras. Una de estas vías y que ocurre con menor frecuencia en las plantas infectadas, es el reconocimiento y unión de la proteína R de la planta hospedera al factor Avr. El segundo mecanismo de interacción incompatible, consiste en un modelo ligando-receptor que propone que la mayoría de las interacciones R-Avr no son directas, ya que las proteínas del patógeno son percibidas mediante un complejo conformado cuando la proteína R (que es una proteína de guardia) reconoce al blanco de virulencia de la planta modificado por el factor Avr del patógeno (Hammond-Kosack y Parker, 2003).

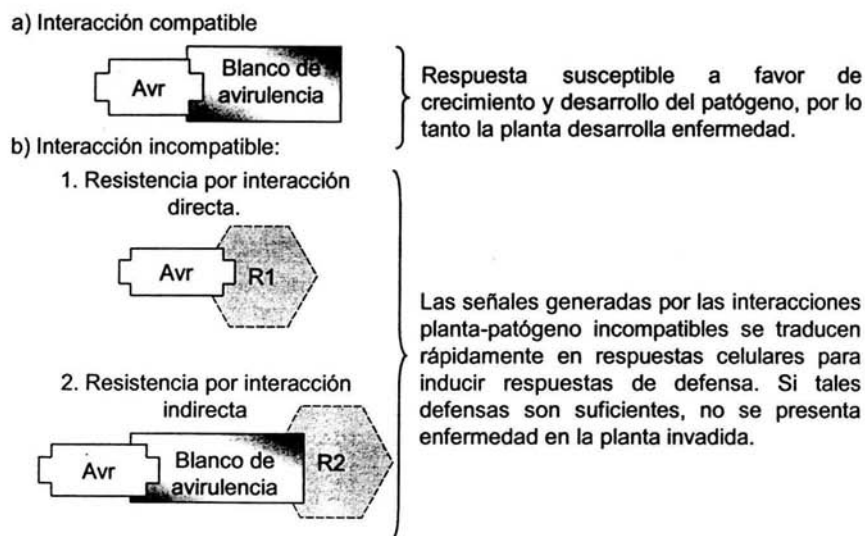


Fig.1 Escenificación de los diferentes tipos de interacción planta-patógeno que ocurren durante la invasión de hongos y bacterias en plantas (Hammond-Kosack y Parker, 2003).

## 2.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA EN PLANTAS

Las plantas hospederas que son resistentes al ataque de patógenos desencadenan numerosas reacciones cuando reconocen al invasor. Las primeras reacciones que se producen se sitúan en la membrana plasmática y comprenden los siguientes eventos: aperturas de canales iónicos, formación de especies reactivas de oxígeno (ROS); (Kombrink y Somssich 1995; Bestwick *et al.*, 1997; Wojtaszek 1997), modificaciones en la polaridad de la membrana y en la actividad enzimática de las NAD(P)H oxidasas, fosfolipasas, fosfatasa y cinasas (Yang *et al.*, 1997). Estas primeras reacciones, tienen efectos inmediatos en varias rutas metabólicas inductoras de respuestas de defensa que permiten la supervivencia de la planta atacada (Somssich y Hahlbrock, 1998).

### 2.2.1. Generación de Especies Reactivas de Oxígeno: primeras respuestas de defensa.

Entre las principales ROS producidas por plantas se encuentran el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El primer anión se genera extracelularmente posiblemente por acción de la NADPH oxidasa asociada a la membrana plasmática y es dismutado rápidamente vía superóxido dismutasa (SOD) o bien, convertido por una ruta no enzimática en  $H_2O_2$ . Esta última molécula tiene la capacidad de atravesar membranas plasmáticas, ya que no contiene electrones desapareados y, una vez dentro de la célula, el  $H_2O_2$  es removido del citoplasma por su transformación eventual en moléculas de agua ( $H_2O$ ) por acción de la catalasa, la ascorbato peroxidasa, o la glutatión peroxidasa (Buchanan *et al.*, 2000). Las células de plantas disponen además, de otros dos mecanismos de generación de ROS: uno de ellos produce  $H_2O_2$  por acción de la proteína oxalato oxidasa, que emplea ácido oxálico como sustrato (Zhang *et al.*, 1995) o por otro mecanismo, que ocurre en la pared celular, donde se producen moléculas de  $H_2O_2$  por la acción de las peroxidasa (Bolwell *et al.*, 1995).

El  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  son especies moderadamente reactivas, de manera que los daños celulares en plantas producidos por ROS se deben a la conversión de estas dos especies en otras más nocivas (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Por ejemplo, la protonación de  $O_2^-$  produce el radical hidropéroxilo ( $HO_2^\cdot$ ), el cual es menos polar que el  $O_2^-$  y, por lo tanto, puede atravesar membranas biológicas. El  $HO_2^\cdot$  puede atacar directamente a los ácidos grasos linolénico, linoléico y araquidónico, transformándolos en peróxidos lipídicos (Halliwell y Gutteridge, 1990) que dañan a las membranas celulares. Por otra parte el  $H_2O_2$  produce

radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) libres en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  (reacción conocida como de Fenton), capaces de iniciar una cadena de reacciones de peroxidación lipídica. De esta forma, al introducirse al citoplasma celular de la planta o del patógeno altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , las moléculas puede llegar al núcleo donde reaccionan con iones metálicos intracelulares y generan radicales  $\cdot\text{OH}$  que fragmentan al DNA en los sitios específicos de ataque (Halliwell y Gutteridge, 1990).

Las ROS participan en la defensa de la planta contra invasores, ya que probablemente producen un estrés oxidativo que limita el daño celular de las plantas (Somssich y Hahlbrock, 1998) y refuerzan las barreras físicas que evitan el ingreso de patógenos (Brady y Fry, 1997). La concentración celular de las ROS parece tener dos efectos diferentes: (1) las ROS en altas concentraciones participan directamente tanto en la muerte del patógeno como en las células de la planta afectadas (Bestwick, 1997; Lamb y Dixon, 1997) y (2) las ROS en bajas concentraciones actúan como señales para la inducción de mecanismos de desintoxicación celular en los que participan las enzimas superóxido dismutasa y glutatión-S-transferasa, así como para la activación de otras reacciones de defensa en las células vecinas (Wojtaszeck, 1997).

### *2.2.2. Respuesta de Hipersensibilidad: muerte celular programada que previene la propagación del patógeno.*

Al reconocer a un patógeno incompatible, la planta resistente activa una serie de respuestas de defensa. Una de las primeras respuestas de la planta es la muerte celular localizada en los sitios de infección, que se conoce como Respuesta de Hipersensibilidad (HR), la cual se define como la muerte de células hospederas inducida por el contacto entre el huésped y el patógeno. La HR es un proceso coordinado temporal y espacialmente, que asegura sean reclutadas la cantidad necesaria de células de plantas en el papel defensivo. Así, la inducción rápida y altamente localizada de las respuestas de defensa en la planta hospedera produce condiciones no favorables tanto para el crecimiento como para la reproducción del patógeno; por lo que, se desintoxican las células de la planta y se dañan las enzimas y toxinas producidas por el patógeno (Buchanan *et al.*, 2000).

Mientras que en las interacciones planta-biótrofos obligados, la muerte celular localizada en plantas hospederas priva al patógeno del acceso de nutrimentos, en las interacciones planta-hemibiótrofos ó planta-necrótrofos, el papel de la HR aún no es clara,

pues los patógenos pueden obtener sus nutrientes a partir de células de plantas muertas (Hammond-Kosack y Jones, 1996). En esencia, la HR es un mecanismo de defensa efectiva contra biótrosos y no biótrosos, ya que la activación de una multitud de genes de defensa producen un ambiente altamente antimicrobiano dentro y alrededor de las células muertas (Goodman y Novacky, 1994; Levine *et al.*, 1994), lo que impide el ataque subsecuente por organismos necrótrofos oportunistas. La ubicuidad de esta respuesta sugiere que se trata de una forma de muerte celular programada (Heath y Skalamera, 1997) y que se encuentra mecanísticamente relacionada con la muerte celular en plantas.

### 2.2.3. Fortalecimiento de la pared celular

El fortalecimiento de la pared celular en plantas incrementa la resistencia a patógenos de varias maneras. Para organismos biótrosos, el fortalecimiento de la pared celular de la planta impide la filtración del invasor al citoplasma, reduciéndoles la disponibilidad de nutrientes, mientras que para los patógenos necrótrofos (que dependen de la hidrólisis de la pared celular) el fortalecimiento de la pared celular del huésped retarda la difusión de toxinas y enzimas que sensibilizan a las células de plantas (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

En plantas resistentes, la invasión de patógenos promueve la producción de precursores de lignina y radicales libres en su pared celular. Estos compuestos afectan la plasticidad membranal del patógeno o bien, inactivan enzimas, toxinas o evocadores derivados del patógeno (Hammond-Kosack y Jones, 1996). El invasor a su vez produce quitinasas, cutinasas y enzimas tales como pectinasas, celulasas, xilanasas y poligalacturonasas (PGs) que atacan a varios polímeros de la pared celular de la planta, produciendo pequeños fragmentos (particularmente oligómeros de ácido galacturónico) que estimulan respuestas de defensa o amplifican alguna de éstas (Farmer y Ryan, 1992; Levine *et al.*, 1994).

Otros eventos frecuentemente asociados con la incompatibilidad de la planta hospedera y el patógeno son la deposición de callosa producida por la callosa sintetasa localizada en la membrana celular y que cataliza la formación del polímero  $\beta$ 1,3-glucano (Kauss, 1990; Ohana *et al.*, 1993) y el incremento de glicoproteínas básicas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) que participan en la organización de la arquitectura celular y en la polimerización de lignina (Showaltwer, 1993; Bolwell *et al.*, 1995).

#### 2.2.4. *Lipooxigenasas*

El rápido incremento de la actividad enzimática de las lipooxigenasas (LOX) y/o el aumento de los niveles de sus mRNA y las correspondientes proteínas lipooxigenasas ha sido frecuentemente asociado con la incompatibilidad planta-patógeno (Slusarenko, 1996). El incremento de la actividad de LOX contribuye de varias formas: por ejemplo, puede generar moléculas de señalización como el ácido jasmónico (JA), metil-JA, o peróxidos lipídicos que amplifican coordinadamente respuestas específicas de defensa. Asimismo, la actividad de LOX puede dañar membranas celulares irreversiblemente, ya que al perderse los componentes lipídicos por peroxidación se promueve la muerte celular (Keppler y Novacky, 1986). Finalmente, las reacciones catalizadas por LOX pueden resultar en la producción de metabolitos secundarios tóxicos derivados de ácidos grasos tanto volátiles como no volátiles que dañen a los invasores directamente (Croft *et al.*, 1993).

#### 2.2.5. *Fitoalexinas*

Las fitoalexinas son un grupo de compuestos muy heterógeno de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas. Las fitoalexinas no se encuentran presentes en plantas sanas, ya que su síntesis es inducida por evocadores de origen biótico y abiótico (Anaya, 2003) que activan la ruta biosintética de un gran número de enzimas. Por lo tanto, los eventos de señalización deben estar altamente coordinados para que se dé lugar a este tipo de respuesta de defensa en las plantas atacadas.

#### 2.2.6. *Metabolitos secundarios: defensas preformadas.*

La mayoría de las plantas sanas poseen metabolitos secundarios, con estructuras muy diversas. Estos compuestos pueden hallarse biológicamente activos ó pueden almacenarse como precursores inactivos en vacuolas u organelos de la capa externa celular del tejido de la planta. Los precursores generalmente se activan durante la invasión de patógenos o daños celulares para conformar respuestas de defensa en la planta (Buchanan *et al.*, 2000).

La razón por la que los metabolitos secundarios participan durante la defensa de la planta es por su actividad antimicrobiana o por su capacidad de modificar características físicas de la pared celular. Además, se ha propuesto que algunos metabolitos secundarios

funcionan como sustancias antibióticas, o bien, como moléculas de señalización (Somssich y Hahlbrock, 1998).

### **2.3. METABOLITOS SECUNDARIOS FÚNGICOS EN LA INVASIÓN DE PLANTAS**

El término metabolismo secundario fue empleado para describir una gran diversidad de vías biosintéticas cuyos productos no están directamente implicados en el metabolismo primario (Deacon, 1997). En general, los metabolitos secundarios son productos naturales con estructura química muy diversa, que no son necesarios forzosamente para el crecimiento; se originan a partir del metabolismo primario y muchos de ellos son de distribución taxonómica restringida. Por lo general, se producen durante una limitada fase del ciclo celular y se originan a través de intermediarios metabólicos comunes, pero por rutas enzimáticas especiales, codificadas por genes específicos (Bennett, 1983). Los hongos producen gran variedad de metabolitos secundarios que tienen un amplio rango de actividades biológicas (Gloer, 1997).

Los metabolitos secundarios de los hongos desempeñan diversas funciones. Una de ellas es su participación en la inducción de enfermedades en plantas al romper el equilibrio químico establecido entre el hongo y su hospedero (Gloer, 1996). Los metabolitos secundarios de hongos que comúnmente participan en la invasión a la planta son los evocadores y las toxinas.

#### *2.3.1. Evocadores y supresores: Factores determinantes en la invasión del patógeno*

Tan pronto como el hongo establece contacto con la planta resistente, ésta lo detecta y lo confronta mediante la acción de un sistema de defensa que prevenga el desarrollo del patógeno. La planta resistente percibe al invasor a través de señales moleculares generadas por el hongo, o bien por la propia planta. Entre las moléculas de señalización generadas por los hongos, se encuentran la quitina y fragmentos de glucano, que están presentes en la superficie del patógeno, y las moléculas de señalización secretadas en forma de proteínas. En plantas, las principales moléculas de señalización que se generan son los oligogalacturonatos que se producen durante la fragmentación de la pared celular de la planta invadida (Knogge, 1996). A las moléculas señales derivadas del patógeno específico o de la pared celular de la planta se les denomina evocadores exógenos y endógenos, respectivamente.

Por lo general, los evocadores son compuestos de bajo peso molecular y de naturaleza química diversa; son sintetizados durante la infección como tales, o bien, como precursores poliméricos y, algunos de éstos, participan tanto en rutas bioquímicas del metabolismo primario como del secundario, lo que dificulta dilucidar sus contribuciones en cada una de estas rutas (Somssich y Hahlbrock, 1998).

Para prevenir ser detectados por la planta hospedera, los hongos han desarrollado mecanismos que evitan su reconocimiento ó que interfieran con los mecanismos de defensa de la planta (Bushnell y Rowell, 1981). Entre una de las estrategias que el hongo implementa se encuentra la secreción de supresores de la respuesta de defensa que interfieren directamente en la unión del evocador, en la transducción de la señal y en la activación de genes o factores de defensa de la planta (Knogge, 1996).

### *2.3.2. Deterioro de las funciones de la planta por toxinas fúngicas*

Las células de las plantas son sistemas complejos que dan lugar a un sinnúmero de reacciones continuamente o en sucesiones determinadas. La alteración de cualquiera de estas reacciones metabólicas causa la interrupción de procesos fisiológicos de la planta por lo que enferma. Entre los factores que inducen tales alteraciones se encuentran las sustancias conocidas como toxinas, las cuales son secretadas por microorganismos patógenos para manipular la fisiología del huésped y, por consecuencia, colonizarlo (Agrios, 1997).

En algunas interacciones planta-patógeno, las toxinas son determinantes para la especificidad, ya que la resistencia o la susceptibilidad del huésped se relaciona con la sensibilidad de éstas hacia las toxinas (Knogge, 1996). Por ejemplo, algunas toxinas son selectivas del huésped, otras son tóxicas sólo en algunas especies o variedades y otras son completamente inocuas (Agrios, 1997).

Como la secreción de toxinas fúngicas en plantas puede ocasionar daños al hombre y animales domésticos al ser ingeridos de manera indirecta, su estudio ha sido extenso. Así, en 1988 fueron descubiertas en Sudáfrica unas toxinas denominadas fumonisinas, asociadas a diversas enfermedades como la leucoencefalomalacia en equinos y al cáncer esofágico en humanos residentes de la región de Transkei, Sudáfrica (Marasas, 2001).



### 2.3.2.1. Fumonisin

Las fumonisinas son una familia de micotoxinas producidas por *Fusarium verticillioides* (anteriormente llamado *F. moniliforme*), las cuales son contaminantes frecuentes del maíz y otros granos. Estas micotoxinas son compuestos polares, solubles en metanol, agua y acetonitrilo; son termoestables, por lo que son resistentes a tratamientos de esterilización en autoclave; asimismo, las fumonisinas son resistentes a tratamientos de cloración (Solfrizzo *et al.*, 2000). Las toxinas se descomponen a temperaturas mayores a 175°C durante 60 minutos a pHs ácidos o alcalinos, generando productos parcialmente hidrolizados (HFBs) a pHs alcalinos. Sin embargo, estos compuestos mantienen su toxicidad al conservar el grupo amino de su estructura (Sánchez, 2003).

Las fumonisinas causan un amplio espectro de enfermedades: cáncer en ratas y humanos, leucoencefalomacia en equinos, edema pulmonar en cerdos, toxicidad en hígado y riñones en múltiples especies y otras enfermedades más (Marasas, 2001). La mayoría de estas afecciones pueden ser resultado de la capacidad que tienen las fumonisinas de alterar el metabolismo esfingolípido mediante la inhibición de la esfinganina N-aciltransferasa (Merrill *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2001). La esfinganina N-aciltransferasa es una enzima que participa en la ruta biosintética *de novo* de esfingolípidos, ya que adiciona un ácido graso a una base esfingoidea para formar una molécula de dihidroceramida. Del mismo modo, esta enzima participa en la reutilización de la esfingosina derivada de la degradación de la mayoría de los esfingolípidos complejos (Merrill *et al.*, 1996; Riley *et al.*, 1996); (Fig. 3). Al ser bloqueada la actividad de la esfinganina N-aciltransferasa, las bases esfingoideas y sus productos de degradación comienzan a acumularse, lo que lleva a la inducción de cambios celulares importantes (Merrill *et al.*, 1997). Por ejemplo, la esfinganina libre en concentraciones altas inhibe el crecimiento celular y es citotóxica (Merrill, 1983; Stevens *et al.*, 1990); la pérdida de esfingolípidos complejos podría provocar la muerte o alterar el crecimiento celular (Nakamura *et al.*, 1996) y la ceramida podría estar regulando el crecimiento y/o la muerte celular (Merrill *et al.*, 1997).

#### 2.3.2.1.1. Fumonisina B<sub>1</sub>: inhibidor de la biosíntesis de esfingolípidos.

La fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) es la fumonisina predominante de este grupo de micotoxinas. Alrededor del 59% del maíz y de sus productos derivados se encuentran contaminados con cantidades variables de FB<sub>1</sub> (Pittet *et al.*, 1992; Haschek *et al.*, 2001).

La FB<sub>1</sub> está compuesta por una larga cadena de aminopentol (AP1) unido a dos ácidos tricarbálicos mediante enlaces éster (Marasas, 2001) y es un análogo estructural de las bases esfingoideas (Fig. 2).

Existe un modelo que propone los mecanismos de inhibición de la esfinganina N-aciltransferasa por efecto de la FB<sub>1</sub> (Desai *et al.*, 2002) el cual plantea que el cuerpo de aminopentol de la FB<sub>1</sub> compite con una base esfingoidea (sustrato de la acilación) por la unión con la esfinganina N-aciltransferasa, al tiempo que los ácidos tricarbálicos de la FB<sub>1</sub> interfieren con la unión del acil-CoA (Merrill *et al.*, 2001). El modelo ha sido justificado por las siguientes evidencias: (1) la potencia con la que FB<sub>1</sub> inhibe a la esfinganina N-aciltransferasa es sensible tanto a concentraciones de bases esfingoideas como de acil-CoA (Merrill *et al.*, 1993); (2) la remoción de los ácidos tricarbálicos de la FB<sub>1</sub> disminuye la fuerza de inhibición de la esfinganina N-aciltransferasa (Humpf *et al.*, 1998) y (3) después de la remoción de los ácidos tricarbálicos, la AP1, que es la FB<sub>1</sub> sin estos ácidos, no es sólo un inhibidor sino un sustrato de la reacción de acilación (Humpf, *et al.*, 1998).

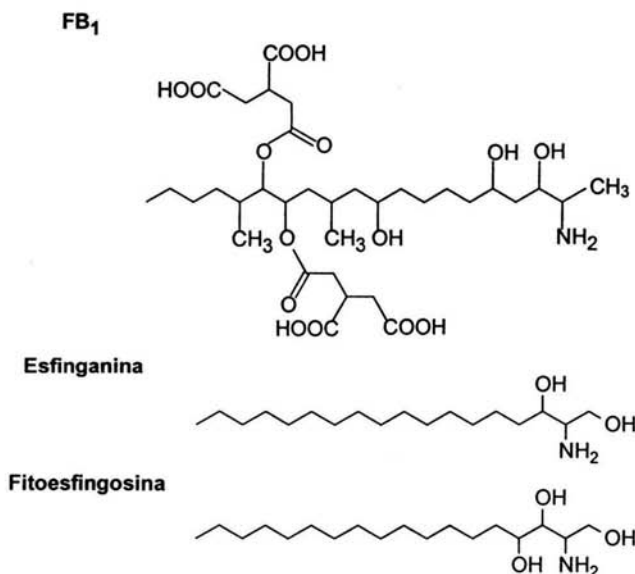


Fig. 2 Estructuras químicas de la toxina fúngica FB<sub>1</sub> y de las bases esfingoideas predominantes en plantas: esfinganina y fitoesfingosina.

Asimismo, la FB<sub>1</sub> podría estar modulando varias rutas de transducción de señales reguladas por esfingolípidos mediante dos mecanismos (Wattenberg *et al.*, 1996): (1) la inhibición de la esfinganina N-aciltransferasa provoca la acumulación de bases esfingoideas

libres en niveles que podrían estar mediando los efectos citotóxicos, citostáticos y mitogénicos de la FB<sub>1</sub> (Yoo *et al.*, 1992; Riley *et al.*, 1994; Schroeder *et al.*, 1994) y (2) la FB<sub>1</sub> podría estarse uniendo directamente a blancos celulares de las bases esfingoideas que son importantes para la modulación de rutas de transducción de señales reguladas por los esfingolípidos (Wattenberg *et al.*, 1996).

Por otro lado, el efecto de la FB<sub>1</sub> sobre el crecimiento de las células se ha examinado principalmente en células de mamíferos con la finalidad de determinar si son estos efectos los causantes de las enfermedades asociadas a la toxina fúngica. Los resultados de estos trabajos han demostrado dos efectos diferentes sobre la proliferación celular: uno inhibitorio sobre las células epiteliales renales, queratinocitos, hepatocitos y células de hepatoma (Gelderblom *et al.*, 1994; Tolleson *et al.*, 1996), en las que se inducen la apoptosis (Tolleson *et al.*, 1996) y el cáncer (Gelderblom *et al.*, 1993) y otro, en el que se estimula la mitogénesis en fibroblastos Swiss 3T3 (Schroeder *et al.*, 1995). En este último sistema celular, se demostró posteriormente que la toxina modulaba la actividad de un par de cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAPKs), ya que estas enzimas participan en las rutas de transducción de señales activadas por una gran diversidad de sustancias inductoras de la proliferación celular (Wattenberg *et al.*, 1996). De igual forma, se ha demostrado que la FB<sub>1</sub> activa a las MAPKs de una manera independiente del efecto inhibitorio de la toxina sobre la biosíntesis de esfingolípidos, ya que la actividad de las MAPKs decremента aún cuando los niveles de bases esfingoideas se incrementan (Pinelli *et al.*, 1999).

#### 2.3.2.1.2. Generalidades de los esfingolípidos

Los esfingolípidos son componentes de las membranas celulares, lipoproteínas (particularmente lipoproteínas de baja densidad) y estructuras celulares ricas en lípidos de células eucarióticas (Merrill *et al.*, 2001). Son compuestos críticos para el mantenimiento de la estructura membranal, especialmente en microdominios como las caveolas (Riboni *et al.*, 1997; Iwabuchi *et al.*, 1998); modulan a receptores del factor de crecimiento (Iwabuchi *et al.*, 1998) y sirven como sitios de unión entre proteínas extracelulares y ciertos microorganismos, toxinas y virus (Karlsson, 1986; Fantini *et al.*, 1997). Los esfingolípidos complejos funcionan como precursores de segundos mensajeros que median respuestas de citocinas y de factores tanto de crecimiento como de diferenciación (Hannun y Obeid, 1995; Fantini *et al.*, 1997; Merrill *et al.*, 1997; Kolesnick y Krönke, 1998; Spiegel, 1999).

Los precursores de los esfingolípidos complejos son las bases esfingoideas, las cuales tienen un arreglo 2-amino-1,3-dihidroxicarbanos o alquenos. En su estructura contienen cadenas alquílicas largas de 14 a 22 átomos de carbono, de 0 a 2 dobles enlaces y otras modificaciones tales como la presencia o ausencia de grupo(s) hidroxilo en las posiciones 4 ó 6 y grupos metilo en  $\omega$ -1 (iso),  $\omega$ -2(anti-iso) (Karlsson, 1970). En las plantas se producen principalmente bases insaturadas tales como esfing-8-eninas, esfing-4, 8-dienos y fitoesfing-(8 o 9)-eninas (Merrill, 2002). Generalmente, las concentraciones celulares de bases esfingoideas libres son muy bajas, ya que la esfinganina biosintetizada *de novo* es rápidamente N-acilada con una larga cadena de ácido graso para formar N-acilesfinganina (dihidroceramida) (Merrill *et al.*, 1997), cuya adición de un doble enlace en el carbono 4 resulta en la formación de ceramida (N-acil-esfingosina).

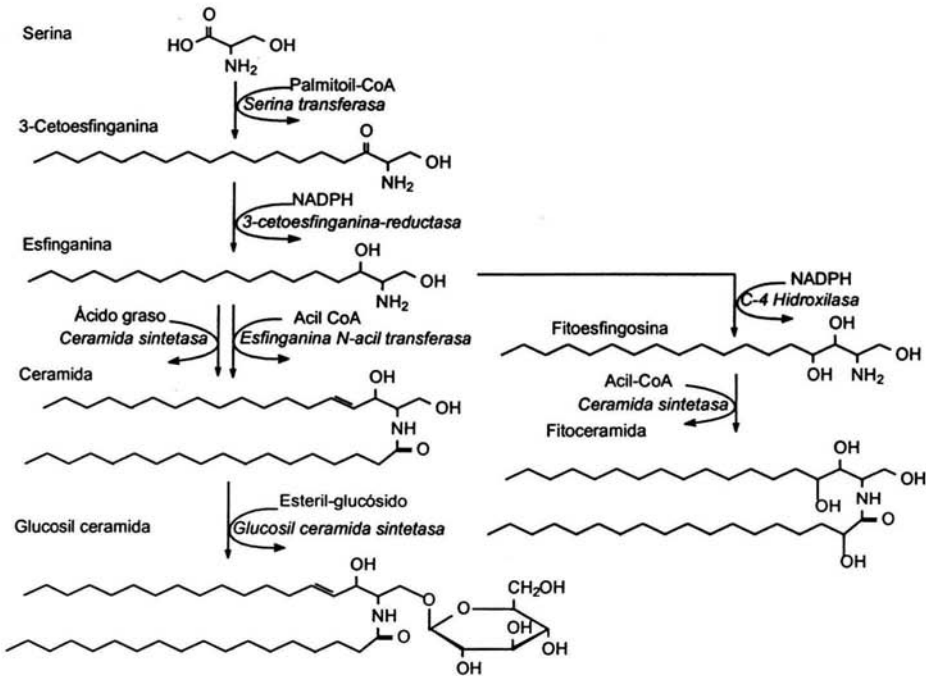


Fig. 3. Ruta de la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos en plantas que muestra a las enzimas participantes durante el proceso (Holthuis *et al.*, 2001).

La ceramida produce esfingolípidos complejos mediante la adición de grupos polares en la posición 1 de su estructura (Merrill *et al.*, 1997) y, entre los esfingolípidos más

frecuentes en plantas, se encuentran los cerebrósidos (mono- y oligohexosilceramidas) que contienen moléculas de glucosa, galactosa, manosa e inositol (Lynch, 1993).

## 2.4. MECANISMOS DE RESPUESTA DE LA PLANTA A PATÓGENOS

La planta resistente al ataque de patógenos, al reconocerlos activa rápidamente mecanismos de defensa en los que participan diversas moléculas de señalización, tales como: el ácido salicílico (SA), el óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS), el ácido jasmónico (JA), el etileno (ET) y las proteínas G, cinasas y fosfatasa.

### 2.4.1. Peróxido de hidrógeno

La generación de  $H_2O_2$  se induce por una gran variedad de estímulos bióticos y abióticos como son: cambios extremos de temperatura, irradiación ultravioleta, exposición de ozono, fitohormonas, deshidratación, heridas, evocadores y, en general, cambios provocados por la invasión de patógenos (Prasad *et al.*, 1994; Lamb y Dixon, 1997; Karpinski *et al.*, 1999; Orozco-Cárdenas y Ryan, 1999; Guan *et al.*, 2000; Langebartels *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2000; A-H-Mackerness *et al.*, 2001).

Puesto que la generación de  $H_2O_2$  se estimula por una gran variedad de tipos de estrés, se ha planteado que funciona como una molécula mediadora en el entrecruzamiento de varias rutas de señalización, o bien, que el  $H_2O_2$  media diferentes respuestas celulares de acuerdo con el sitio de su síntesis o de su percepción (Bowler y Fluhr, 2000).

En plantas, posiblemente el  $H_2O_2$  actúa como molécula de señalización durante la inducción de respuestas moleculares, bioquímicas y fisiológicas; para dilucidar las funciones del  $H_2O_2$  como molécula de señalización en las interacciones planta-patógeno, se ha recurrido extensamente al modelo de suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana* (Neill *et al.*, 2002). Estas suspensiones producen  $H_2O_2$  al ser tratadas con evocadores derivados de patógenos (Desikan *et al.*, 1996; Clarke *et al.*, 2000). El incremento en la producción de  $H_2O_2$  induce los siguientes eventos: (1) la muerte celular programada (PCD), (2) la expresión de genes de defensa (Desikan *et al.*, 1998, 2000), (3) la expresión de la glutatión S-transferasa (GST), que desintoxica a las células de la planta infectadas, y (4) la expresión de la fenilalanina amonio-liasa (PAL), que participa en la síntesis de compuestos relacionados con la defensa (Desikan *et al.*, 1998). Además de estas respuestas bioquímicas, los estudios en *A. thaliana* también han permitido demostrar la participación del  $H_2O_2$  en la inducción de

respuestas fisiológicas, pues el  $H_2O_2$  induce el cierre estomatal en respuesta tanto al ácido abscísico (ABA), como a evocadores producidos por patógenos (Mc Ains *et al.*, 1996; Allan y Fulhr, 1997; Lee *et al.*, 1999; Pei *et al.*, 2000).

#### 2.4.2. Óxido nítrico

Recientemente, se descubrió la presencia de moléculas de óxido nítrico (NO) gaseoso en plantas (Wild *et al.*, 1997) y se ha postulado que posiblemente controla el crecimiento de raíces y actúa como factor tanto de la maduración como de la senescencia (Leshem *et al.*, 1998). En plantas, el NO probablemente es sintetizado por varias rutas: a) las enzimáticas: por acción de la óxido nítrico sintetasa (NOS); (Barroso *et al.*, 1999; Corpas *et al.*, 2001) y/o por la nitrato reductasa (Yamasaki y Sakihama, 2000; Wojtaszek, 2000); y b) las no enzimáticas (Neill *et al.*, 2002).

Actualmente, aún no se han caracterizado por completo los blancos del NO, sin embargo, se sabe que éste reacciona directamente con proteínas vía una nitrosilación que activa la expresión de genes de defensa durante la interacciones planta-patógeno (Durner y Klessig, 1999), que participa en la señalización redox durante las respuestas de defensa (Sanz *et al.*, 1998) y que participa en la modulación de los niveles de hierro celulares (Navarre *et al.*, 2000).

Un dato interesante es que la producción de NO ocurre bajo las mismas condiciones en que se estimula la generación de  $H_2O_2$ , por lo que se ha planteado que tengan un efecto sinérgico y/o aditivo en las plantas (Neill *et al.*, 2002).

#### 2.4.3. Hormonas

Las hormonas de las plantas son mediadoras del desarrollo endógeno y participan en la integración de señales extracelulares para regular y optimizar el crecimiento de la planta (Grill y Himmelbach, 1998). Entre las hormonas predominantes en plantas se encuentran: el ácido salicílico (SA), el etileno (ET) y el ácido abscísico (ABA).

##### 2.4.3.1. Ácido Salicílico

El SA es una molécula de señalización cuya función ha sido extremadamente polémica; se sintetiza posiblemente por dos rutas: una a partir de la fenilalanina y la otra a partir del corismato vía isocorismato (Shah, 2003).

En interacciones planta-patógeno incompatibles, el SA induce la expresión de diversos genes relacionados con la defensa contra hongos, bacterias y posiblemente contra virus (Murphy *et al.*, 1999). Junto con esta expresión de genes, las plantas resistentes desarrollan la HR, la cual al momento de activarse, induce la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) (Ryals *et al.*, 1996), que coincide con el incremento del SA sintetizado endógenamente, no sólo en el sitio de infección sino sistémicamente en los tejidos no infectados. Son por estas razones que se considera al SA como un componente clave durante la señalización de la SAR, aunque se desconoce si efectivamente es el SA la molécula señal que establece y mantiene la SAR y que se transporta vía el floema desde hojas infectadas con patógenos hacia hojas no infectadas (Durner *et al.*, 1997), o bien, si actúa indirectamente para la inducción de la SAR. Esta segunda propuesta se ha planteado como hipótesis: (1) que el SA inhibe la actividad de la catalasa y/o peroxidasa, ocasionando así un incremento de los niveles endógenos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de otras ROS derivadas de éste, los cuales podrían estar actuando como segundos mensajeros para la activación de la expresión de los genes de defensa, o (2) que el SA interactúa con las enzimas catalasa y/o peroxidasa para producir radicales libres de SA, los cuales estarían induciendo la peroxidación lipídica, cuyos productos actuarían como moléculas de señalización (Durner *et al.*, 1997).

#### 2.4.3.2. Etileno

El etileno (ET) es un gas similar a las moléculas de NO, ya que ambas tienen la capacidad de atravesar membranas celulares (Lowenstein y Snyder, 1992); participa en rutas de señalización que comprenden varios procesos como son: la maduración de la fruta, la senescencia de la hoja, la promoción o inhibición de la germinación de la semilla, la floración y la elongación celular; su síntesis se incrementa por efecto de varios tipos de estrés como son las bajas temperaturas, las heridas y el ataque de patógenos, ya que éstos controlan la expresión de genes que codifican enzimas que sintetizan al ET (Abeles *et al.*, 1992). A pesar de conocer completamente la ruta biosintética del ET, aún se desconocen los mecanismos de su percepción y señalización (Ouaked *et al.*, 2003) en las células de plantas.

#### 2.4.3.3. Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es un regulador negativo del crecimiento y se encuentra relacionado con varios procesos de desarrollo y fisiológicos de la planta (Davies, 1995). El

ABA participa en la maduración de la semilla, en la germinación y en la regulación estomatal. Al igual que el ET, el ABA responde a diferentes tipos de estrés abióticos tales como la deshidratación, salinidad, bajas temperaturas y el estrés osmótico. El ABA es capaz de promover la expresión de ciertos genes inducibles por estrés aun cuando el organismo no es expuesto a estrés alguno (Meskiene y Hirt, 2000).

#### 2.4.4. Proteínas R

Las proteínas de resistencia (R) poseen una característica muy particular: contienen en su secuencia un número variable de repeticiones ricas en leucina (LRRs); (Dangl y Houb, 1997). Las proteínas R participan en la interacción proteína-proteína, en la unión péptido-ligando y en la interacción proteína-carbohidrato (Kobe y Deisenhofer, 1995; Jones y Jones, 1996).

En los genomas de las plantas, los genes R se encuentran organizados generalmente en grupos y es, esta característica, la que le confiere a la planta hospedera de patógenos: a) múltiples especificidades contra varios genotipos de parásitos; b) protección y c) alternativas genéticas de reserva para su defensa (Dangl y Holub, 1997).

Las proteínas R se han clasificado principalmente en dos clases: Una de ellas corresponde a las proteínas R cuyos dominios LRRs se encuentran en la región N-terminal. La segunda clase se refiere a las proteínas R, cuyos dominios LRRs se encuentran en el C-terminal. Este último grupo de proteínas contiene además tres motivos con sitio de unión a nucleótidos (GTP o ATP) y se les ha denominado repeticiones ricas en leucina con sitio de unión a nucleótidos (NB-LRR) (Dangl y Holub, 1997).

#### 2.4.5. Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas están conformadas por tres subunidades: la  $G\alpha$ , la  $G\beta$  y la  $G\gamma$  (Bischoff *et al.*, 1999); están codificadas por un gran número de genes que participan en varios procesos de señalización en células eucarióticas (Neer, 1995; Borkovich, 1996) y funcionan como puente entre los Receptores Acoplados a las Proteínas G (GPCR) y los efectores: fosfolipasas, adenilato ciclasas, fosfodiesterasas, canales iónicos y cinasas de proteína. La unión de un ligando extracelular a los GPCR altera la conformación del receptor y como consecuencia se asocia con una proteína G heterotrimérica intracelular, en donde cataliza el intercambio de GDP a GTP sobre la subunidad  $G\alpha$  para disociarla de las



subunidades G $\beta\gamma$ . Una vez disociadas las subunidades, éstas regulan generalmente a los efectores corriente abajo.

De manera contraria, la inhibición de las proteínas G heterotriméricas ocurre cuando la GTPasa de la subunidad G $\alpha$  se encuentra en su forma que une GDP y se reasocia nuevamente con el dímero G $\beta\gamma$  (Bischoff *et al.*, 1999).

#### 2.4.6. *Proteínas G pequeñas*

Las proteínas G pequeñas se dividen en varias familias: la familia Ras, la familia Rab, la familia Arf/Sar, la familia Rho y la familia Ran (Bischoff *et al.*, 1999). Todas ellas regulan un conjunto de procesos que incluyen el importe endocítico y exocítico del tráfico de membranas, mantienen la integridad de organelos, el ensamble de las proteínas de las vesículas, la expansión del RE, la vesiculación del aparato de Golgi, la regulación del citoesqueleto, la activación de lipasas y el control de la transcripción (Sander y Valencia, 1995; Garcia-Ranea y Valencia, 1998).

Las GTPasas Ras, Rab y Rho se modifican post-traduccionalmente por una isoprenilación en el C-terminal y las Arf por una miristoilación en el N-terminal. Estas modificaciones son las que hacen posible su localización en las membranas. Mientras que la GTPasa Ras siempre se encuentra unida a la membrana, los ciclos de las GTPasas Arf, Rab y Rho se encuentran entre el citosol y las membranas; el mecanismo por el cual estas proteínas son transportadas a las membranas aún se desconoce (Bischoff *et al.*, 1999).

La forma activa de estas proteínas ocurre cuando se encuentran unidas al GTP- interactuando con sus efectores-, mientras que la forma inactiva da lugar cuando se encuentran unidas al GDP. El intercambio GDP/GTP es catalizado por factores de intercambio del nucleótido de guanina (GEFs); (Bischoff *et al.*, 1999).

#### 2.4.7. *Cinasas de proteína: mecanismos básicos de regulación*

Las células regulan su actividad enzimática mediante la modificación covalente reversible de ciertas proteínas, la cual se consigue frecuentemente mediante la adición de un grupo fosfato a un residuo de serina, treonina o tirosina localizados en las proteínas conocidas como cinasas (Alberts *et al.*, 1994).

Las cinasas pertenecen a la segunda clase más importante de las transferasas (Dixon, 1979) y trasladan el grupo fosfato desde un nucleósido trifosfato como el ATP a una molécula

aceptora que puede ser un azúcar, una proteína, otro nucleótido o un intermediario metabólico (Lehninger, 1993).

Las estructuras de las cinasas de proteína son muy similares entre sí, conservan 12 subdominios cuyos residuos participan en papeles estructurales y funcionales, y difieren en otras partes del dominio cinasa, o bien, en el número de dominios o subunidades adicionales (Johnson *et al.*, 1996).

La fosforilación específica de los residuos de Thr, Ser o Tyr de la cinasa puede ocurrir en varios sitios de la proteína; algunos de éstos se hallan en las regiones N-terminal o C-terminal de la cadena polipeptídica, que se pueden localizar tanto en el exterior del dominio cinasa como en otras subunidades. Sin embargo, la mayoría de las cinasas son fosforiladas sobre un(os) residuo(s) localizado(s) en el centro del dominio cinasa conocido como "segmento de activación", el cual contiene una región de secuencias conservada de DFG (Asp-Phe-Gly) y APE (Ala-Pro-Glu). El segmento de activación participa directamente en la activación de la enzima cinasa, ya que provoca cambios conformacionales que conducen a la disposición correcta del sitio de unión al sustrato y de los grupos catalíticos, y evita bloqueos estéricos para tener acceso a los sustratos (Johnson *et al.*, 1996).

Algunas cinasas de proteína tienen la capacidad de autofosforilarse y esta propiedad es determinada por la especificidad de su secuencia y por el segmento de activación que rodea al residuo fosforilado (Johnson *et al.*, 1996). De igual forma, existen otras cinasas que requieren de la fosforilación para su activación y las posibles razones que explican esta característica son las siguientes: 1) Todas las cinasas de proteína que son fosforiladas en el segmento de activación, contienen en su secuencia un residuo de aspartato (Asp) relacionado con el mecanismo catalítico, ya que posiblemente es el responsable de la activación del grupo hidroxilo del sustrato que está por llegar; 2) La mayoría de las cinasas de proteína Ser/Thr y todas las cinasas de proteína de Tyr contienen un residuo de arginina (Arg) inmediatamente anterior al Asp catalítico. Estas proteínas, denominadas cinasas "RD" (Arg-Asp), son activadas mediante la fosforilación en el segmento de activación que contiene una secuencia RD, requieren de interacciones iónicas entre la arginina y el fosfato o un grupo carboxilato, para neutralizar la carga del grupo de residuos básicos que incluye a la arginina de la secuencia RD. Las interacciones iónicas pueden tener otros efectos como la autoinhibición del segmento de activación, la promoción de la orientación adecuada del dominio y el alineamiento correcto de residuos de unión al ATP (Johnson *et al.*, 1996).

De acuerdo a sus dominios catalíticos, las cinasas de proteína se clasifican en cinco grupos: (1) el grupo AGC, el cual contiene familias de cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos (PKA y PKG); (2) el grupo CAMK que contiene tanto a la familia de cinasas dependientes de calcio/calmodulina como a la familia de cinasas de proteína activadas por SNF1/AMP (CaMK); (3) el grupo CMGC, el cual contiene a las familias CDK, MAPK, GSK-3 y CKII; (4) el grupo PTK, que se refiere a las cinasas de proteína de tirosina y (5) el grupo que contiene otras cinasas de proteína aún no clasificadas (Stone y Walker, 1995).

#### 2.4.7.1. Grupo AGC

En el grupo AGC se encuentran las cinasas de proteína dependientes de los nucleótidos cíclicos: cAMP (PKA) y cGMP (PKG) y las cinasas dependientes de Calcio-fosfolípidos (PKC); la mayoría de las actividades de estas cinasas están reguladas por segundos mensajeros y en plantas no se han caracterizado suficientemente los miembros de este grupo (Stone y Walker, 1995).

#### 2.4.7.2. Grupo de las CaMK

En el grupo de las CaMKs se encuentran las cinasas de proteína dependientes de calcio/calmodulina y las cinasas de proteína que se activan para responder al estrés nutricional o ambiental que sufren las células eucarióticas (SNF1/AMP). Las cinasas de este grupo, al igual que las cinasas AGC, son reguladas por segundos mensajeros y las familias más representativas de este grupo, son las cinasas de proteína con dominio como calmodulina CDPKs y las cinasas homólogas a SNF1 (SNF1 es una proteína cinasa de levadura que se requiere para la derepresión catabólica del carbono), las cuales se han identificado en varias especies de plantas (Stone y Walker, 1995).

#### 2.4.7.3. Grupo de las cinasas CMGC

En el grupo de las CMGCs se encuentran las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), las cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), las cinasas de las sintetasas de glucógeno (GSK-3) y las cinasas de caseína II (CKII). La actividad de este grupo de cinasas está regulada por cascadas de fosforilación y los sitios de fosforilación se encuentran comúnmente entre los subdominios VII y VIII del segmento de activación (Wei *et al.*, 1994).

#### 2.4.7.4. Cinasas de proteína PTK

Las cinasas PTK son una familia de enzimas reguladoras importante en células eucarióticas. Esta familia de proteínas es específica de Tyr, por lo que difiere de las cinasas de proteína con doble especificidad. En plantas, no se han identificado miembros de esta familia, sin embargo, no se descarta su presencia (Stone y Walker, 1995).

#### 2.4.7.5. Cinasas de proteína receptoras

La familia de cinasas de proteína receptoras (RLK) son proteínas transmembranales que contienen tanto dominios de cinasa de serina/treonina en el citoplasma como otros dominios diferentes en la región extracelular (Morris y Walker, 2003). De acuerdo a su dominio extracelular, las RLKs se puede unir a carbohidratos, polipéptidos, componentes de la pared celular de microorganismos o esteroides (Shiu y Bleecker, 2001).

En plantas, las RLKs parecen estar involucradas en las respuestas de defensa contra patógenos. Por ejemplo, los miembros de la familia de cinasas asociadas a la pared celular (WAK) interactúan con la pectina y otras proteínas localizadas en la pared celular (Wagner y Kohorn, 2001) para intervenir posiblemente durante la comunicación entre la pared y la membrana celular durante el ataque de patógenos (Morris y Walkner, 2003). Las cinasas-1 receptoras extensas en prolina (PERK1) –nombradas así por contener un dominio extracelular rico en prolina (41% prolina)- responden a cambios físicos de la pared celular de *Arabidopsis* y *Brassica* (Silva y Goring, 2002).

## 2.5. MAP CINASAS: RECEPTORES ESPECÍFICOS DURANTE LA SEÑALIZACIÓN EN PLANTAS

### 2.5.1. Generalidades de las cascadas de MAP cinasas

Las cascadas de cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAP cinasas) son módulos universales de transducción de señales que se encuentran en células eucarióticas transducen un estímulo externo proveniente del ambiente, o bien, de otros organismos, para inducir un intervalo amplio de respuestas celulares (Ichimura *et al.*, 2002).

Una de las funciones de las MAP cinasas es amplificar señales; sin embargo, no es necesariamente la principal (Ferrel, 1996), ya que la percepción y transducción de señales son eventos tan complejos que no todos los organismos son capaces de responder a todas sus modalidades. La percepción de señales depende de varios factores como son la

intensidad, retención, brevedad y periodicidad de la misma, mientras que, por ejemplo, la transducción de señales se dificulta si las células están percibiendo continuamente diversos estímulos (Hall *et al.*, 2002), ya que la célula se ve obligada a transducir simultáneamente las diferentes señales.

La señalización celular mediada por MAP cinasas, pese a su ubicuidad y diversidad, es un evento altamente regulado. Por ejemplo, las fosfatasa de proteína regulan negativamente a los miembros que conforman la cascada de las MAP cinasas y las MAPKKKs y MAPKKs al contener múltiples sitios de fosforilación, le confieren a la cascada flexibilidad para transmitir más de una señal de forma simultánea (Denhardt, 1996).

Las cascadas de MAP cinasas presentan propiedades cinéticas muy particulares: responden a los estímulos casi inmediatamente; por lo que se consideran moléculas reguladoras (Zhang y Liu, 2001); discriminan pequeñas perturbaciones de la señal e inducen una respuesta siempre y cuando la señal se mantenga y sea duradera (Ferrel, 1996). Estas propiedades son las que hacen suponer que la duración de la actividad de las MAP cinasas es la que determina el efecto celular resultante (Hall *et al.*, 2002).

En plantas, se han identificado diferentes miembros que conforman cascadas de MAP cinasas y diversos genes que las codifican, particularmente, en especies de alfalfa (Duerr *et al.*, 1993; Jonak *et al.*, 1993, 1995, 1996; Bögre *et al.*, 1999), *Arabidopsis* (Mizoguchi *et al.*, 1993, 1994), avena (Huttly y Phillips, 1995), perejil (Ligterink *et al.*, 1997), chícharo (Stafstrom *et al.*, 1993), petunia (Decroocq-Ferrant *et al.*, 1995) y tabaco (Wilson *et al.*, 1993, 1995, 1997; Seo *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998). La secuencia de residuos de estas MAP cinasas está muy conservada en toda su longitud y presenta una similitud mayor en los once subdominios indispensables para la función catalítica de las cinasas de proteína de serina/treonina. Los residuos de las regiones N- y C- terminales fuera de los 11 subdominios difieren más que los del núcleo catalítico, sin embargo, se conservan en algunos subgrupos, por lo que se consideran importantes para algunas funciones biológicas tales como la especificidad del sustrato o para el establecimiento de interacciones con otras proteínas (Bögre *et al.*, 2000).

### 2.5.2. Conformación de la cascada de MAP cinasas.

El arreglo básico de una cascada de MAP cinasa consiste en un módulo de tres cinasas (Fig. 4). La MAPK es la última cinasa de la cascada en activarse y lo hace cuando

una MAPKK fosforila los residuos de tirosina y treonina de su secuencia característica TxY (donde x representa a cualquier aminoácido); (Meskiene y Hirt, 2000). La MAPKK, responsable de la activación de la MAPK, requiere ser previamente activada y esto sucede cuando una MAPKKK fosforila los residuos de serina y treonina catalíticos que se encuentran conservados entre los subdominios VII y VIII de las MAPKKs (Alessi *et al.*, 1994; Zheng y Guan, 1994). Si la fosforilación requerida para su activación ocurre en otros residuos diferentes a los mencionados, entonces su actividad es regulada negativamente (Rossomando *et al.*, 1994).

En general, las cascadas de MAP cinasas no están relacionadas directamente con los receptores membranales de señales, ya que son preferencialmente activadas por otros componentes cuya actividad depende del receptor membranal. Tales componentes incluyen otras cinasas de proteína, como la proteína cinasa C (PKC) o la proteína cinasa p21<sup>ras</sup>-activada (PAK) y las proteínas de unión a GTP (proteínas-G), que pueden ser de ambos tipos: monomérico y heterotrimérico (Hall *et al.*, 2002).

En células de mamíferos y levaduras, las MAPKs activadas en el citoplasma pueden trasladarse: (a) al núcleo, en donde activan factores de transcripción a través de una reacción de fosforilación para activar así la expresión de genes y (b) a otros sitios del citoplasma para fosforilar enzimas específicas, tales como cinasas de proteína, fosfatasa, lipasa, etc., o bien, componentes citoesqueléticos (Bögge *et al.*, 2000). En plantas, no se ha identificado algún sustrato *in vivo* (Zhang y Klessig, 2001) sin embargo, se han propuesto diversos candidatos como son: enzimas metabólicas, cinasas de proteína y factores de transcripción (Suzuki, 2002).

#### 2.5.2.1. MAPKKKs

Los componentes de la cascada de MAP cinasas que estructuralmente difieren más son las MAPKKKs (Wrzaczek y Hirt., 2001), las cuales pueden contener: secuencias reguladoras localizadas en dominios con homología Pelckstrin (PH); secuencias ricas en prolina involucradas en la unión a SH3; motivos de dedos de zinc; cierres de leucina; sitios de unión para proteínas G o bien; varios sitios de fosforilación de serina/treonina (Garrington y Johnson, 1999). La heterogeneidad estructural de las MAPKKKs y de sus dominios reguladores le confiere a la cascada de señalización varias características como son: (1) flexibilidad para responder a una gran variedad de estímulos (Meskiene y Hirt, 2000) y (2) la capacidad de alimentar múltiples cascadas de MAP cinasas (Fanger *et al.*, 1997; Gustin *et al.*, 1998).

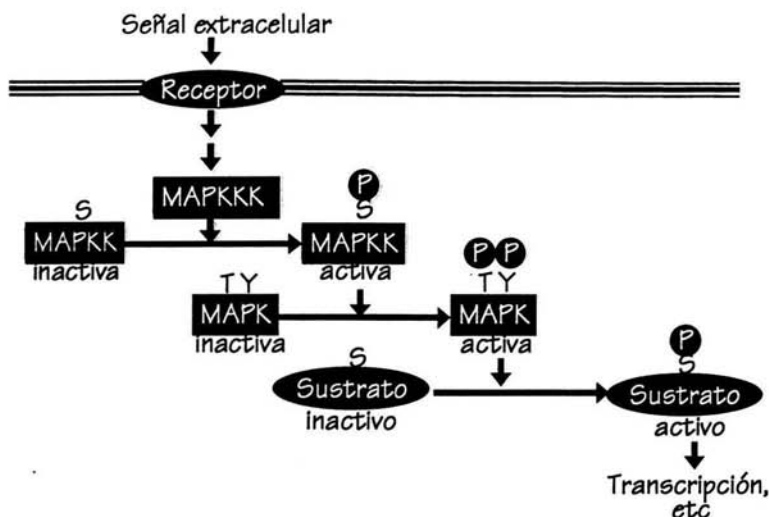


Fig. 4 Esquema simplificado del funcionamiento de las cascadas de MAP cinasas. La percepción de una señal extracelular por un receptor membranal lleva a la activación del módulo de las cinasas, en el que la MAPKKK activa a la MAPKK y ésta a su vez activa a la MAPK. La activación de la cascada requiere de varias reacciones río arriba, mientras que río abajo, la MAPK puede activar a otras cinasas de proteína, fosforilar componentes citoesqueléticos o trasladarse al núcleo para activar factores de transcripción que lleven a la expresión de ciertos genes (Jonak *et al.*, 1999).

En células de mamíferos y levaduras, las MAPKKs se clasifican en cuatro grupos: las cinasas MEKK/STE11, las cinasas Raf, las cinasas MLK y las cinasas MOS (Widmann *et al.*, 1999), mientras que en plantas se clasifican únicamente en tres grupos: el A o PMEKKs, cuyos miembros son similares al grupo de MEKK/Ste11/ Bck1 y los grupos B y C o PRAF cuyas MAPKKs son similares a las RAF cinasas (Ichimura *et al.*, 2002) (Fig. 5).

#### 2.5.2.2. MAPKKs

Las MAPKKs son consideradas proteínas con doble especificidad, ya que activan a las MAPKs a través de la fosforilación de los residuos de treonina y tirosina de la secuencia TxY; tienen especificidad restringida al sustrato, ya que únicamente activan MAPKs (Seger *et al.*, 1992); funcionan únicamente en una o dos cascadas de MAP cinasas distintas (Robinson y Cobb, 1997) y se consideran puntos de convergencia, ya que pueden integrar diferentes señales en una misma ruta (Meskiene y Hirt, 2000).

### Árbol filogenético

### Características

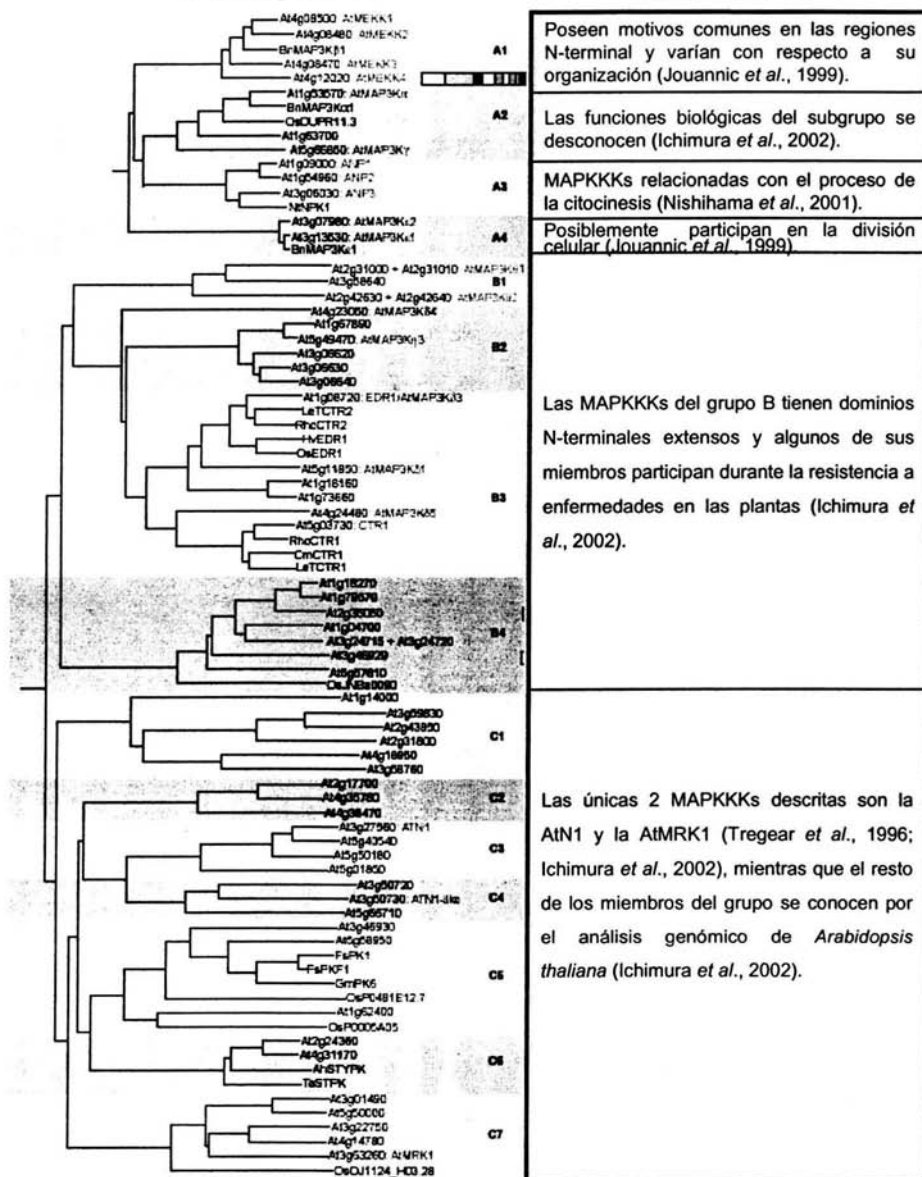


Fig. 5 Árbol filogenético y propiedades de las posibles proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKKK). Para identificar las especies de origen de cada MAPKKK, las primeras iniciales de sus nombres anteceden al nombre de la proteína: Ah, *Arachis hypogaea*; At, *Arabidopsis thaliana*; Bn, *Brassica napus*; Cm, *Cucumis melo*; Fs, *Fagus sylvatica*; Gm, *Glycine max*; Hv, *Hordeum vulgare*; Le, *Lycopersicon esculentum*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Os, *Oryza sativa*; Rhc, *Rosa hybrid cultivar*; Ta, *Triticum aestivum* (Modificado de Ichimura *et al.*, 2002)



En plantas se han identificado alrededor de 21 MAPKKs (Fig. 6), las cuales son diferentes a las de mamíferos por presentar una secuencia consenso en el sitio de fosforilación de S/TxxxxS/T, ya que la de mamíferos es de S/TxxxS/T (Ichimura *et al.*, 2002). Las regiones N-terminal de ambos tipos de MAPKKs son muy similares entre sí, ya que presentan un sitio de unión [KR][K/R][K/R]x(1-5)[L/I]x[L/I].

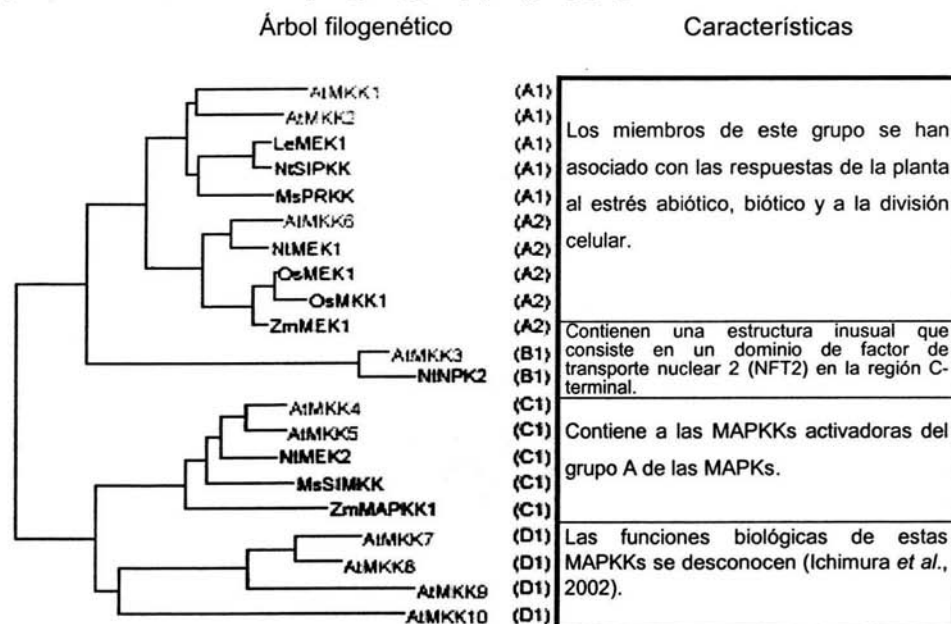


Fig. 6 Árbol filogenético y propiedades de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKK). Para identificar las especies de origen de cada MAPKK, las primeras iniciales de sus nombres anteceden al nombre de la proteína: At, *Arabidopsis thaliana*; Le, *Lycopersicon esculentum*; Ms, *Medicago sativa*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Os, *Oryza sativa*; Zm, *Zea mays* (Modificado de Ichimura *et al.*, 2002)

### 2.5.2.3. MAPKs

La activación de MAPKs requiere de la fosforilación de los residuos de treonina y tirosina que se localizan en los subdominios VII y VIII del núcleo catalítico (Bögge *et al.*, 2000); se caracterizan por contener en su secuencia un dominio CD que funciona como sitio de unión para las MAPKKs, fosfatasa y proteínas sustrato al contener una secuencia de residuos: [LY][LHY]Dxx[DE]xx[DE]EPxC. Los residuos ácidos adyacentes D y E son fundamentales para la interacción con los residuos básicos K y R de las MAPKKs (Tanoue *et al.*, 2000). Los residuos hidrofóbicos (L, H y Y) del dominio CD de las MAPKs, se unen a los residuos hidrofóbicos (LxLxL) localizados en el sitio de unión de las MAPKKs (Ichimura *et al.*, 2002).



Las MAPKs de los grupos: A, B y C contienen una secuencia TEY, mientras que las del grupo D contienen la secuencia TDY (Fig. 7); los dominios CD de las MAPKs de los grupos A y B están muy conservados en la región C-terminal, mientras que los del grupo C se han modificado posiblemente a través de la evolución y las MAPKs del grupo D no los contienen (Ichimura *et al.*, 2002).

### 2.5.3. Las MAP cinasas y su participación en respuesta a estímulos externos.

En plantas, las cascadas de MAP cinasas están involucradas en respuestas, tanto a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, como a hormonas, a procesos de división y al desarrollo celular (Ichimura *et al.*, 2002); por lo tanto, éstas participan cuando las plantas son estimuladas con diferentes tratamientos tales como la infección por patógenos, lesiones, cambios extremos de temperatura, sequía, hiper- e hipo-osmolaridad, salinidad elevada, contacto, especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tena *et al.*, 2001; Zhang y Klessig, 2001; Romeis, 2001; Morris, 2001), ozono e irradiación ultravioleta (UV) (Tabla 1).

#### 2.5.3.1. MAP cinasas y estimulación mecánica

Las plantas se hallan constantemente expuestas a estreses mecánicos causados por contacto, aire y lluvia. Estas diferentes estimulaciones inducen varias respuestas fisiológicas en la planta como son: el crecimiento diferencial, la reducción en la velocidad de crecimiento y el reforzamiento de sus paredes celulares (Meskiene y Hirt, 2000).

Unos de los primeros efectos que responden al estrés mecánico son el cambio de concentración de calcio citoplásmico y la fosforilación de proteínas tales como las MAP cinasas. Por ejemplo, en hojas de *Arabidopsis* se acumulan transcritos de los genes *AtMPK3* y *AtMEKK1*, los cuales codifican una MAPK y una MAPKKK, respectivamente (Mizoguchi *et al.*, 1996). En hojas de alfalfa también se activa la SAMK, una MAPK activada por estrés (Bögge *et al.*, 1996).

#### 2.5.3.2. MAP cinasas y señalización causada por lesiones.

Uno de los tipos de estrés abiótico más severo y predominante en plantas es la lesión producida por daño mecánico o por ataque de patógenos y/o herbívoros. La planta, para evitar ser dañada, activa a un grupo de genes que codifican proteínas que responden a patógenos (PR) e inhibidores de proteasas (PIN); (Meskiene y Hirt, 2000). Algunos de estos genes se inducen únicamente a nivel local, mientras que otros se expresan sistémicamente para proteger a toda la planta (Bowles, 1993).

Tabla 1. Evidencia de la participación de MAP cinasas en la transducción de señales en plantas (Jonak *et al.*, 1999)

Estímulo	Especies	Sistema	Proteína/ge ne	Resulta en:
Frio	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plantas crecidas <i>in vitro</i>	<i>AtMPK3</i>	Inducción de los transcritos de <i>AtMPK3</i>
	<i>Medicago sativa</i>	Plantas crecidas en tierra	p44 <sup>MMK4</sup>	Inducción de la actividad de la cinasa Inducción de los transcritos de <i>MMK4</i> (niveles constantes de la proteína <i>MMK4</i> )
Sequía	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plantas crecidas <i>in vitro</i>	<i>AtMPK3</i>	Inducción de los transcritos de <i>AtMPK3</i>
	<i>Medicago sativa</i>	Plantas crecidas <i>in vitro</i>	p44 <sup>MMK4</sup>	Inducción de la actividad de la proteína cinasa <i>MMK4</i>
Estrés con sal	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plantas crecidas <i>in vitro</i>	<i>AtMPK1</i> <i>AtMPK3</i>	Inducción de los transcritos de <i>AtMPK1</i> Inducción de los transcritos de <i>AtMPK3</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plantas crecidas <i>in vitro</i>	<i>AtMPK3</i>	Inducción de los transcritos de <i>AtMPK3</i>
Contacto	<i>Medicago sativa</i>	Suspensión celular de hojas	p44 <sup>MMK4</sup>	Inducción de los transcritos de <i>MMK4</i>
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Plantas	p48	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa
Heridas	<i>Medicago sativa</i>	Hojas	p44 <sup>MMK4</sup>	Inducción de la actividad de la proteína cinasa <i>MMK4</i> Inducción de los transcritos de <i>MMK4</i> (niveles constantes de la proteína <i>MMK4</i> )
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Discos de hojas Plantas	p46 <sup>PMSAP</sup> p47	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa Inducción de una proteína cinasa <i>MBP</i> Inducción de transcritos de <i>WIPK</i> Silenciamiento del gen endógeno de <i>WIPK</i>
Evocador bacteriano	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hojas	p49	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa
Evocador fúngico	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión celular	p48 <sup>SIPK</sup>	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa Inducción de la actividad de la <i>SIPK</i> (niveles constantes de la proteína <i>SIPK</i> ) Niveles constantes del transcrito de la <i>SIPK</i>
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión celular	p44	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión celular	p40	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión celular	p48	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa
	<i>Peteroselinum crispum</i>	Suspensión celular	p45 <sup>ERMK</sup>	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa Inducción de la actividad de la proteína cinasa <i>ERMK</i> Inducción de los transcritos de la <i>ERMK</i> Transporte nuclear
Quitosano	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Plantas	p48	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Discos de hojas	p46 <sup>PMSAPK</sup>	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa
PGA	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Plantas	p48	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa
SA	<i>Nicotiana tabacum</i>	Cultivo en suspensión	p48 <sup>SIPK</sup>	Inducción de la actividad de la <i>SIPK</i>
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Discos de hojas	p46 <sup>PMSAPK</sup>	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa
GA	<i>Avena sativa</i>	Células de aleurona	<i>AsPK9</i>	Regulación río abajo de los transcritos
ABA	<i>Hordeum vulgare</i>	Protoplastos de aleurona		Inducción de la proteína cinasa fosfotirosina/ <i>ERK1</i>
Etileno	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mutante	<i>CTR1</i>	Regulador negativo de la respuesta de etileno
Auxina	<i>Nicotiana</i>	Cultivo en suspensión	p46	Inducción de una proteína <i>MBP</i> -cinasa

Desarrollo de polen	<i>tabacum</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	Polen	p45 <sup>Ntf4</sup>	Inducción de la actividad de la proteína Ntf4 cinasa
Germinación del polen	<i>Nicotiana tabacum</i>	Polen	p45 <sup>Ntf4</sup>	Inducción de los transcritos de Ntf4 Incremento en los niveles de la proteína Ntf4 Inducción de la actividad de la proteína Ntf4 (niveles constantes de proteína Ntf4)

Tanto en especies monocotiledóneas como dicotiledóneas, las plantas lesionadas activan MAP cinasas para conformar respuestas de defensa; por ejemplo, las lesiones en tabaco inducen la activación de la WIPK (Proteína Cinasa Inducida por Herida); (Seo *et al.*, 1995) y la SIPK (Proteína Cinasa Inducida por SA); (Zhang y Klessig, 1998).

#### 2.5.3.3. MAP cinasas y estimulación oxidativa

La producción de ROS es una de las primeras respuestas en plantas resistentes a patógenos (Lamb y Dixon, 1997) y se relaciona además con la activación de respuestas adaptativas en plantas estimuladas con diferentes tipos de estrés abiótico (Usami *et al.*, 1995; Cazalé *et al.*, 1999; Samuel *et al.*, 2000). Por ejemplo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> además de actuar como un estrés, funciona como una molécula de señalización para favorecer y retroalimentar la activación de cascadas de MAP cinasas (Zhang y Klessig, 2001).

#### 2.5.3.4. MAP cinasas y estimulación osmótica

Las plantas responden a la estimulación osmótica y uno de los mecanismos que implementan para hacerlo es la activación de MAP cinasas. Por mencionar algunos casos, en células de alfalfa estimuladas con sal en una concentración de 100 a 500 mM, se activa la SIMK (Proteína Cinasa Inducida por Sal); (Munnik *et al.*, 1999), mientras que en concentraciones mayores se induce únicamente la actividad de una cinasa de 38 kDa (posiblemente perteneciente a la familia de cinasas SNF1). Esto ha hecho suponer que existan 2 osmosensores que perciban presiones osmóticas de acuerdo a su intensidad (Meskiene y Hirt, 2000). Asimismo, en suspensiones celulares de tabaco estimuladas con tratamientos osmóticos, se ha detectado la inducción de la SIMK y la WIPK; la SIMK es activada por tratamiento hiper- e hipo-osmóticos, mientras que la WIPK sólo se induce con tratamiento hipoosmótico (Mikolajczyk *et al.*, 2000; Hoyos y Zhang, 2000; Droillard *et al.*, 2000).

#### 2.5.3.5. El papel de las cascadas de MAP cinasas en la señalización hormonal de las plantas.

Una de las hormonas mejor estudiadas y que induce la actividad de algunas MAP cinasas en *Arabidopsis thaliana* y *Medicago sativa* es el etileno; esta hormona induce en células de *Medicago* la actividad tanto de la SIMK como de la MMK3, siendo el componente que se localiza arriba de ambas MAPKs la SIMKK, que además es la responsable del fenotipo de la "triple respuesta constitutiva" característica del tratamiento con etileno (Ouaked *et al.*, 2003). Asimismo, en células de *Arabidopsis*, se había reportado anteriormente la participación de la *CTR1* que codifica una proteína cinasa homóloga a la clase de las MAPKKs Raf de mamíferos (Kieber *et al.*, 1993), la cual resulta ser el componente localizado arriba de la SIMKK (Ouaked *et al.*, 2003).

También, se ha reportado la activación de cinasas inducidas por el ABA, sin embargo, aún se desconoce si éstas cinasas son MAP cinasas (Li y Assman, 1996; Mori y Muto, 1997).

#### 2.5.3.6. MAP cinasas y respuesta a patógenos

Las plantas que son atacadas por patógenos, desarrollan diversas estrategias de defensa como son las barreras físicas y químicas y las inducidas (reforzamiento de sus paredes celulares, producción de fitoalexinas y activación transcripcional de genes de defensa) (Yang *et al.*, 1997).

Recientemente, en plantas se han identificado diversas MAP cinasas activadas tanto por evocadores fúngicos y bacterianos como por infecciones con patógenos (Tabla 2). Estas evidencias indican que las cascadas de MAP cinasas participan en la señalización de defensa y que constituyen el principal mecanismo para activar las respuestas de defensa (Cardinale *et al.*, 2000).

#### 2.5.4. Inhibición de la cascada de MAP cinasas.

La inhibición de las cascadas de MAP cinasas es tan importante como la activación misma; este evento ocurre cuando las proteínas fosfatasas defosforilan los residuos de treonina y/o tirosina de la secuencia TxY de las MAPKs (Meskiene y Hirt, 2000).

Básicamente las fosfatasas se han agrupado de acuerdo a la especificidad de su sustrato en tres familias: (i) las proteínas fosfatasas de Tyr (PTPasas); (ii) las proteínas fosfatasas de amplio espectro (DsPTPasas) que pueden defosforilar tanto a residuos de Tyr como de Thr de la secuencia de MAPKs y (iii) las proteínas fosfatasas de Ser/Thr (PPPasas y PPMasas). Dentro de la familia de las PPPasas se encuentran las fosfatasas PP1, PP2A y PP2B, de éstas sólo la PP2B requiere de  $Ca^{2+}$  para su actividad catalítica. Las PPMasas comprenden las proteínas fosfatasas PP2C, las piruvato deshidrogenasas fosfatasas y otras fosfatasas Ser/Thr que son dependientes de  $Mg^{2+}$  (Kerk *et al.*, 2002).

Tabla 2. MAPKs inducidas durante la infección de plantas con patógenos.

Estímulo	Especie	Sistema	Resulta en:
Evocador derivado de la pared celular de <i>Phytophthora infestans</i> (PIE)	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión celular	Inducción de la actividad de una MAPK de 47 kDa (Suzuki y Shinshi, 1995).
SA	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión celular	Inducción de la actividad de la SIPK, peso molecular de 50 kDa (Zhang y Klessig, 1997)
Evocador derivado de la pared celular de <i>Phytophthora parasitica</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión celular	Inducción de la actividad de la SIPK, peso molecular de 50 kDa (Zhang <i>et al.</i> , 1998)
			Inducción de la actividad de la WIPK, peso molecular de 46 kDa (Zhang <i>et al.</i> , 1998)
Criptogeína	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión celular	Inducción de la actividad de la SIPK, peso molecular de 50 kDa (Zhang <i>et al.</i> , 1998)
			Inducción de la actividad de la WIPK, peso molecular de 46 kDa (Zhang y Klessig, 1998; Zhang <i>et al.</i> , 1998)
			Inducción de la actividad de una MAPK de 40 kDa (Zhang <i>et al.</i> , 1998)
Parasiticeína	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión celular	Inducción de la actividad de la SIPK, peso molecular de 50 kDa (Zhang <i>et al.</i> , 1998)
			Inducción de la actividad de la WIPK, peso molecular de 46 kDa (Zhang y Klessig, 1998; Zhang <i>et al.</i> , 1998)
			Inducción de la actividad de una MAPK de 40 kDa (Zhang <i>et al.</i> , 1998)
Harpina, evocador producido por <i>Erwinia amylovora</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hojas	Inducción de la actividad de una MAPK de 49 kDa (Hoyos <i>et al.</i> , 1998)
Xilanasa (TxX), evocador fúngico producido por <i>Trichoderma viride</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión celular	Inducción de la actividad de una MAPK de 47 kDa (Suzuki <i>et al.</i> , 1999).
Proteína Avr9 del hongo patógeno <i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Suspensión celular que expresa el gen de resistencia de tomate Cf-9	Inducción de la actividad de la SIPK, peso molecular de 50 kDa (Romeis <i>et al.</i> , 1999)
			Inducción de la actividad de la WIPK, peso molecular de 46 kDa (Romeis <i>et al.</i> , 1999)
Evocador de levadura (YE)	<i>Medicago sativa</i>	Suspensión celular	Inducción de la actividad de las MAPKs: SIMK, MMK3, MMK2 y SAMK (Cardinale <i>et al.</i> , 2000)
Componentes del YE: Quitina $\beta$ -glucano Ergosterol	<i>Medicago sativa</i>	Suspensión celular	Inducción de la actividad de la SIMK, MMK2 y MMK3, (Cardinale <i>et al.</i> , 2000) Inducción de la actividad de la SIMK, MMK2 y MMK3 (Cardinale <i>et al.</i> , 2000) Inducción de la actividad de la SIMK, MMK3 y SAMK (Cardinale <i>et al.</i> , 2000)
Virus del Mosaico de Tabaco (TMV)	<i>Nicotiana tabacum</i>		Inducción de la actividad de la SIPK, peso molecular de 50 kDa (Zhang y Klessig, 1998)

			Inducción de la actividad de la WIPK, peso molecular de 46 kDa e independiente del SA (Zhang y Klessig, 1998)
SA	<i>Glycine</i>	Cultivo celular	Activación bifásica de una MAPK de 48 kDa, nombrada GmSIPK ( <i>Glycine max</i> SIPK); (Anstätt y Tenhaken, 2003)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Glycinea</i>	<i>max</i>		

Las PTPasas contienen un motivo activo con la secuencia (I/V)HCXAGXXR(S/T)G, el cual contiene un residuo de cisteína indispensable para su actividad catalítica tanto en plantas como en animales (Gupta *et al.*, 1998, 2003; Xu *et al.*, 1998), dado que participa como un nucleófilo que desplaza al grupo fosfato del sustrato y forma un intermediario de reacción (Guan, 1994). Este tipo de fosfatasa tiene un origen y mecanismo catalítico diferentes a las proteínas Ser/Thr (Kerk *et al.*, 2002).

Las fosfatasa DsPTPasas contienen: un motivo activo cuya secuencia es VXVHCXXGXSRSXTXXXAY(L/I)M, el cual presenta cierta similitud al motivo de las PTPasas pero no al de las PPPasas; y una especificidad muy restringida (Gupta *et al.*, 1998), pues cada isoforma de DsPTPasas pueden defosforilar y regular únicamente una o dos MAPKs (Luan, 2002).

En general, las interacciones entre las fosfatasa y las cascadas de MAP cinasa han sido poco estudiadas y entre las mejor analizadas se encuentran las fosfatasa de animales y levaduras, ya que algunas de éstas se han clonado y caracterizado (Meskiene y Hirt, 2000).

Con respecto a las fosfatasa de plantas, las fosfatasa mejor caracterizadas son las del tipo Ser/Thr (Luan *et al.*, 1993; Stone y Walker, 1995; Smith y Walker, 1996), ya que no ha resultado fácil identificar o caracterizar en estos sistemas a las principales fosfatasa que inactivan MAPKs en animales y levaduras, las DsPTPasas.

La secuencia del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* ha permitido estimar el número de fosfatasa que son codificadas por el organismo. Aparentemente existen 112 fosfatasa en el genoma de *A. thaliana*, de las cuales 69 corresponden a PP2C, 23 a fosfatasa Ser/Thr, 18 a DsPTPasas y una a LMW-PTP (Kerk *et al.*, 2002). La única DsPTPasa analizada en el organismo ha sido la AtDsPTP1 (Gupta *et al.*, 1998).

En general, se ha demostrado que las fosfatasa regulan la actividad basal de las MAP cinasa de plantas, ya que la actividad de MAP cinasa se mantiene o se induce por efecto del uso de inhibidores de fosfatasa. Asimismo, se ha demostrado que se requiere de la síntesis *de novo* de las fosfatasa de proteína para inhibir a las MAP cinasa (Suzuki y Shinshi, 1995; Adam *et al.*, 1997; Bögre *et al.*, 1997, Suzuki *et al.*, 1999).



### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

---

Se han encontrado durante la germinación del maíz, diversas modificaciones a nivel bioquímico y molecular por efecto de la toxina fúngica FB<sub>1</sub>, entre las que se encuentran:

- 1) Cambios en los componentes de la membrana plasmática:
  - a) Aumento en la permeabilidad (Gutiérrez *et al.*, 1999a)
  - b) Disminución de la fluidez membranal (Gutiérrez *et al.*, 1999b)
  - c) Inhibición de la glucan sintetasa II (Garibay *et al.*, 2000; Enríquez *et al.*, 2001)
  - d) Inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> (Gutiérrez, 1999c)
  - e) Inhibición de cinasas membranales (Carmona, 2003)
- 2) Incremento de los niveles de esfinganina y fitoesfingosina en células de embriones de maíz en una proporción con respecto al control, de:
  - a) 3.6 veces de PS (homogenados totales) (Rivas, 2001)
  - b) 6.1 veces de SN (homogenados totales) (Rivas, 2001)
  - c) 4.4 veces de PS (Microsomas) (Gutiérrez *et al.*, 2001)
  - d) 10.5 veces de SN (Membrana Plasmática) (Gutiérrez *et al.*, 2001)
- 3) La expresión de componentes de la Respuesta de Hipersensibilidad (HR):
  - a) Incremento de los transcritos de la HGRP (SanJuan, 2001)
  - b) Degradación del ácido desoxirribonucleico (Alcántara, 1998; De la Torre *et al.*, 2003)
  - c) Incremento de los niveles endógenos de SA (Rivas *et al.*, 2003)

Como puede observarse, varias de las modificaciones encontradas hasta el momento parecen conformar una respuesta de defensa de los embriones de maíz contra el hongo patógeno, ya que constituyen elementos de la respuesta de hipersensibilidad, una de las primeras respuestas de defensa generadas por las plantas resistentes durante la invasión de patógenos no compatibles. Asimismo, estos resultados también sugieren que los intermediarios del metabolismo de los esfingolípidos están mediando esta respuesta.

Por otra parte, en la literatura está bien documentada la activación de las MAP cinasas en las rutas de transducción de señales desencadenadas por patógenos, siendo las mejor caracterizadas las MAP cinasas activadas por efecto de evocadores fúngicos (ver Tablas 2 y 3). No obstante, también han sido descritas algunas MAP cinasas activadas por efecto de

evocadores bacterianos (ver Tablas 2 y3). Existen además, dos reportes del efecto de la FB<sub>1</sub> sobre la actividad de MAPKs de mamíferos (Wattenberg *et al.*, 1996; Pinelli *et al.*, 1999).

En conjunto, estos antecedentes nos han llevado a hipotetizar que la actividad de alguna(s) MAP cinasa(s) se verá(n) modificada(s) al exponer a los embriones de maíz al metabolito secundario (FB<sub>1</sub>) producido por *Fusarium verticillioides*.

De igual forma, la demostración de que algunos esfingolipidos y sus precursores funcionan como segundos mensajeros en células animales y de que uno de los efectos de la FB<sub>1</sub> en embriones de maíz es incrementar algunos compuestos esfingoideos, hace probable que estos compuestos y las MAP cinasas estén involucradas en las mismas vías de transducción de señales desencadenadas por patógenos.

## 4. HIPÓTESIS

---

---

La exposición de los embriones de maíz a la fumonisina B<sub>1</sub> y a los compuestos esfingoideos producidos por *Fusarium verticillioides*, patógeno natural del maíz, afecta la actividad de sus MAP cinasas.

## 5. OBJETIVOS

---

---

### OBJETIVO GENERAL

Identificar los efectos de la toxina FB<sub>1</sub> producida por el hongo *Fusarium verticillioides* y de los compuestos esfingoideos esfinganina, fitoesfingosina y ceramida en la actividad de MAP cinasas de los embriones de maíz.

### OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Determinar el efecto de FB<sub>1</sub>, SN, PS y CE tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* sobre la actividad de las MAP cinasas de las fracciones citosólicas de los embriones de maíz.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

---

---

### 6.1 *Material biológico.*

Embriones de maíz Chalqueño, cosecha marzo 2002, adquiridas en Chalco, Edo. de México.

### 6.2 *Imbibición de embriones de maíz con FB<sub>1</sub>, SN, PS o CE.*

Los embriones de maíz fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 10% y se distribuyeron homogéneamente 2 gramos en cajas de Petri que contenían tanto a la agarosa disuelta en buffer de imbibición, como a los compuestos de estudio (exposición *in vivo*), a las concentraciones indicadas en cada experimento. Los embriones se embebieron a 29 °C durante el tiempo necesario para el tipo de ensayo (ver Apéndice).

### 6.3 *Extracción de la fracción citosólica.*

Para la extracción de la fracción citosólica, se pulverizaron los embriones de maíz congelados en nitrógeno líquido y se homogenizaron en presencia de un buffer de homogeneización. El homogeneizado se centrifugó con el objetivo de obtener al sobrenadante que contenía a las proteínas del extracto y se congeló a -70°C (ver Apéndice).

### 6.4 *Cuantificación de proteína*

Se probaron varias técnicas de determinación de proteínas, ya que en la mayoría de éstas existía una interferencia de consideración causada por el buffer de homogeneización. Las técnicas probadas fueron:

- ◆ Bradford: Se fundamenta en la unión del azul de Coomassie y las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas y iónicas. Las proteínas estabilizan la forma aniónica del colorante causando un cambio de color visible en un intervalo de longitud de onda de 465 a 565 nm.
- ◆ Densitometría obtenida por digitalización: La concentración de proteínas presentes en extractos crudos de tejidos animales y de plantas se puede determinar mediante dos procedimientos combinados: la tinción de las proteínas con azul de Coomassie y la densitometría obtenida después de la digitalización de la imagen. Es un método ampliamente usado cuando se necesita procesar un gran número de muestras, ya que es un método que interfiere poco con varias sustancias como son la clorofila, el ditiotreitol, el SDS, el 2-

mercaptoetanol, el Nonidet P-40 y el fluoruro de fenilmetilsulfonyl (y otros inhibidores de proteasas). Asimismo, es un método sensible que puede detectar concentraciones proteicas entre 100 y 200 ng/ $\mu$ L.

◆ **Determinación de proteínas con el KIT ESL de Roche Diagnostics (Exacto, Sensible y de Baja interferencia):** Es un método espectrofotométrico que utiliza una reacción similar a la de biuret, donde el  $\text{Cu}^{2+}$  forma inicialmente un complejo en medio alcalino. El contenido de proteína es determinado al medir la absorbancia de un complejo de batocuproína- $\text{Cu}^+$ , el cual se forma cuando hay un exceso de  $\text{Cu}^{2+}$  no quelado por las proteínas. El exceso de  $\text{Cu}^{2+}$  es reducido a  $\text{Cu}^+$  con ácido ascórbico y éste forma un complejo colorido con la batocuproína. De esta manera, la señal es inversamente proporcional a la cantidad de uniones peptídicas.

◆ **Comparación con vesículas membranales:** Para la calibración de la concentración de proteínas del extracto, se cargaron volúmenes arbitrarios de las fracciones citosólicas paralelamente a cantidades conocidas de proteínas de vesículas membranales en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Al teñir los geles con azul de Coomassie se realizaba una comparación visual entre estas cantidades de proteínas y, si era necesario, se corrían geles con volúmenes corregidos de las fracciones citosólicas hasta conseguir su calibración con respecto a las proteínas de las vesículas membranales.

◆ **Precipitación con etanol-acetona:** La precipitación fue empleada para separar y concentrar a las proteínas de la fracción citosólica, eliminando reactivos presentes en el buffer de homogenización que interferían con la determinación de proteínas por el método de Lowry-Peterson. Al término de la precipitación se realizó la determinación de proteínas por el método de Lowry-Peterson (ver Apéndice).

◆ **Lowry:** El método se basa en la reacción del biuret que incorpora el uso del reactivo de Folin para enriquecer el desarrollo de color. Es un método ampliamente usado, ya que es hasta 100 veces más sensible que la reacción del biuret. En el método de Lowry, la proteína es tratada con sulfato cúprico en medio alcalino en presencia de tartrato y durante la incubación se adiciona el reactivo de Folin. El desarrollo de color es causado por una oxidación catalizada por el cobre del agente de Folin sobre los aminoácidos aromáticos y otros grupos, el producto es reducido formando una coloración azul que se lee a 750 nm, de manera que la mayoría de los grupos funcionales son los responsables de la intensidad de esta coloración. La intensidad de color varía de acuerdo a la composición de aminoácidos de las proteínas y de las condiciones analíticas, de manera que el color no es estrictamente

proporcional a la concentración de proteínas. Es un método relativamente específico, ya que algunas sustancias presentes en materiales biológicos presentan interferencias altas (ver Apéndice).

#### 6.5 *Ensayo en solución para determinar actividad de cinasas de la proteína básica de la mielina (MBP).*

El ensayo en solución consistió en adicionar directamente MBP, sustrato de diversas cinasas en particular MAP cinasas, a un buffer de reacción de fosforilación con  $ATP^{32}P$ . Al estar en contacto la MBP con la fracción citosólica tratada o no con la  $FB_1$  o compuestos esfingoideos, fue fosforilada por algunas cinasas. La mezcla de reacción fue aplicada posteriormente a geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie o nitrato de plata, secados, expuestos y obtenidas sus autorradiografías (ver Apéndice).

##### 6.5.1 *Ensayos de estandarización de fosforilación de la MBP.*

Para determinar la actividad de cinasas de MBP por efecto de la  $FB_1$  y compuestos esfingoideos, fue necesario optimizar las condiciones de fosforilación de la MBP para mejorar la visualización en las autorradiografías de la proteína sustrato marcada radioactivamente. Por ello, se estudiaron las siguientes condiciones:

- ◆ La relación óptima entre las cantidades de la fracción citosólica y de la MBP.
- ◆ La concentración de ATP frío.

Para la primera condición se incubaron diferentes cantidades de proteínas del extracto con una misma cantidad de MBP en la reacción de fosforilación (Tabla 4), de manera que la relación entre las concentraciones de las proteínas de la FC y la MBP variaba. Posteriormente, muestras de estas combinaciones se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, se tiñieron con azul de Coomassie y se expusieron a películas radiográficas (ver Apéndice).

Tabla 3. Composición del Buffer de Fosforilación para el ensayo de fosforilación de MBP

Solución	HEPES	MgCl <sub>2</sub>	DTT	NaF	MBP	ATP	[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP
Conc. Stock	400 mM	200 mM	50 mM	500 mM	4 $\mu$ g/ $\mu$ L	1 mM	-
Conc. requerida	40 mM	20 mM	2 mM	10 mM	0.5 $\mu$ g/ $\mu$ L	50 $\mu$ M	1 $\mu$ C <sub>i</sub>
Para 10 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L	0.4 $\mu$ L	0.2 $\mu$ L	1.25 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	*

Tabla 4. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación para el ensayo con diferentes relaciones MBP/FC.

Relación MBP/FC	Buffer de Fosforilación	H <sub>2</sub> O	Fracción citosólica (FC)	Vol final	Tiempo de incubación	Buffer de digestión
0.5	*	*	7 µg	10 µL	15'	10 µL
0.33	*	*	10.5 µg	10 µL	15'	10 µL
0.25	*	*	14 µg	10 µL	15'	10 µL
0.20	*	*	17.5 µg	10 µL	15'	10 µL
0.17	*	*	21 µg	10 µL	15'	10 µL
0.14	*	*	24.5 µg	10 µL	15'	10 µL
-	*	*	7 µg	10 µL	15'	10 µL

\* La cantidad añadida está basada en el cálculo del decaimiento del radioisótopo con respecto al tiempo

Con respecto a la segunda condición experimental para optimizar la fosforilación de la MBP, se varió la concentración del ATP no marcado (frío) en el buffer de reacción (Tabla 5), de manera que la relación entre el ATP frío y el caliente (no radioactivo) variaba. La mezcla general de reacción está descrita en la Tabla 6 y los procedimientos posteriores a la reacción de fosforilación fueron los mismos que para la condición de estudio anterior y están descritos en el Apéndice.

Tabla 5. Composición del Buffer de Fosforilación para el ensayo con diferentes concentraciones de ATP

Solución	HEPES	MgCl <sub>2</sub>	DTT	NaF	MBP	ATP								[γ- <sup>32</sup> P]-ATP
Conc. Stock	400 mM	200 mM	50 mM	500 mM	4 µg/µL	100 µM				1 mM				-
Conc requerida	40 mM	20 mM	2 mM	10 mM	0.5 µg/µL	0 µM	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	75 µM	100 µM	150 µM	1 µCi
Para 10 µL	1.0 µL	1.0 µL	0.4 µL	0.2 µL	1.25 µL	-	0.5 µL	1.0 µL	2.5 µL	0.5 µL	0.75 µL	1.0 µL	1.5 µL	*

Tabla 6. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación para el ensayo de la Tabla 5.

Tubo	Buffer de Fosforilación	H <sub>2</sub> O	Fracción citosólica	Vol total	Tiempo de incubación	Buffer de digestión
0 µM	*	*	7 µg	10 µL	15'	10 µL
5 µM						
10 µM						
25 µM						
50 µM						
75 µM						
100 µM						
150 µM						

\* La cantidad añadida está basada en el cálculo del decaimiento del radioisótopo con respecto al tiempo

Por otro lado, para evaluar la actividad total de cinasas de las FCs, éstas se incubaron de forma independiente en el buffer de reacción (Tabla 7) que contenía α-caseína de leche bovina (Sigma), histona tipo III-S de becerro Thymus (Sigma), o MBP de cerebro bovino (Sigma), como sustratos de diferentes cinasas. La incubación se realizó como se describe en la Tabla 8 y los procedimientos posteriores están descritos en el Apéndice.

Tabla 7. Composición del Buffer de Fosforilación para caseína, histona o MBP.

Solución	HEPES	MgCl <sub>2</sub>	DTT	NaF	Caseína o Histona o MBP	ATP	$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP
Conc. Stock	400 mM	200 mM	50 mM	500 mM	4 $\mu$ g/ $\mu$ L	1 mM	-
Conc requerida	40 mM	20 mM	2 mM	10 mM	0.71 $\mu$ g/ $\mu$ L	50 $\mu$ M	1 $\mu$ C <sub>i</sub>
Para 8 $\mu$ L	0.8 $\mu$ L	0.8 $\mu$ L	0.32 $\mu$ L	0.16 $\mu$ L	1.43 $\mu$ L	0.4 $\mu$ L	*

Tabla 8. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación para el ensayo de la Tabla 7.

Tubo	Buffer de Fosforilación	H <sub>2</sub> O	Fracción citosólica	Vol total	Tiempo de incubación	Buffer de digestión
MBP	*	*	10 $\mu$ g	10 $\mu$ L	15'	16 $\mu$ L
Caseína						
Histona						

\* La cantidad añadida está basada en el cálculo del decaimiento del radioisótopo con respecto al tiempo

### 6.5.2 Fosforilación de la MBP por los extractos citosólicos expuestos a la FB<sub>1</sub> y compuestos esfingoideos (*ensayo in vitro*).

La exposición *in vitro* se refiere a la adición directa de los compuestos esfingoideos y la FB<sub>1</sub> a la mezcla general de reacción, la cual contiene a las fracciones citosólicas provenientes de los embriones de maíz embebidos en ausencia de los compuestos de estudio. Los ensayos se realizaron en varias condiciones como se detalla a continuación.

#### 6.5.2.1 Efecto del tiempo de exposición sobre la actividad de cinasas de MBP

Las proteínas de las FCs fueron incubadas en presencia o ausencia de la FB<sub>1</sub>, SN, PS o CE en la mezcla general de reacción (Tabla 10), la cual contenía al buffer de reacción de fosforilación (Tabla 9). La mezcla de la reacción de fosforilación se incubó a 25°C por el periodo de tiempo indicado en la Tabla 10.

Tabla 9. Composición del Buffer de Fosforilación de MBP en presencia de compuestos esfingoideos.

Solución	HEPES	MgCl <sub>2</sub>	DTT	NaF	MBP	ATP	$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP
Conc. Stock	400 mM	200 mM	50 mM	500 mM	4 $\mu$ g/ $\mu$ L	1 mM	-
Conc requerida	40 mM	20 mM	2 mM	10 mM	0.71 $\mu$ g/ $\mu$ L	50 $\mu$ M	1 $\mu$ C <sub>i</sub>
Para 8 $\mu$ L	0.8 $\mu$ L	0.8 $\mu$ L	0.32 $\mu$ L	0.16 $\mu$ L	1.43 $\mu$ L	0.4 $\mu$ L	*

Tabla 10. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación para el ensayo de la Tabla 9.

Tubo	Buffer de fosforilación	10 $\mu$ M FB <sub>1</sub> , SN, PS o CE	H <sub>2</sub> O	Fracción citosólica	Vol total	Tiempo de incubación	Buffer de digestión
A (1-5)	*	-	*	10 $\mu$ g	8 $\mu$ L	2' 5' 10' 20' 30'	16 $\mu$ L
B-E (1-5)	*	✓	*	10 $\mu$ g	8 $\mu$ L	2' 5' 10' 20' 30'	16 $\mu$ L

\* La cantidad añadida está basada en el cálculo del decaimiento del radioisótopo con respecto al tiempo  
 NOTA: Los experimentos posteriores fueron realizados con el buffer de reacción de fosforilación descrita en la Tabla 6 y el tiempo de incubación de las fracciones citosólicas en la mezcla de reacción fue de 15'.



### 6.5.2.2 Efecto de la concentración de la FB<sub>1</sub> y compuestos esfingoideos sobre la actividad de cinasas de MBP.

Se realizaron experimentos tipo dosis-respuesta para determinar el comportamiento de las cinasas de MBP activadas por efecto de cada uno de los compuestos de estudio adicionados en 5 diferentes concentraciones: 1, 10 y 100 nM, y 1 y 10 μM. La FB<sub>1</sub>, SN, PS y CE fueron adicionadas directamente a la mezcla general de reacción (Tabla 11) y se siguió el mismo procedimiento posterior para detectar a la MBP por autorradiografía (ver Apéndice).

Tabla 11. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación de MBP en presencia de diferentes concentraciones de compuestos esfingoideos.

Tubo	Buffer de fosforilación	FB <sub>1</sub> , SN, PS o CE	Concentración						H <sub>2</sub> O	Fracción citosólica	Vol final	Buffer de digestión
			nM			μM						
A-E (1-6)	*	✓	0	1	10	100	1	10	*	10 μg	8 μL	16 μL

\* La cantidad añadida está basada en el cálculo del decaimiento del radioisótopo con respecto al tiempo

### 6.5.3. Fosforilación de la MBP por efecto de la exposición in vivo de la FB<sub>1</sub> y compuestos esfingoideos.

La exposición *in vivo* se refiere a la adición de los compuestos esfingoideos y la FB<sub>1</sub> al medio de imbibición de los embriones de maíz. A los extractos obtenidos de estos embriones se les añadió la MBP en el medio de fosforilación. Se emplearon tres tiempos de incubación de los embriones con los compuestos: 6, 12 y 24 horas, dependiendo del tipo de experimento a realizar.

#### 6.5.3.1. Comparación de los efectos in vivo e in vitro de la FB<sub>1</sub> y los compuestos esfingoideos en la fosforilación de la MBP

En un mismo gel se corrieron las muestras de las reacciones de fosforilación de MBP (Tabla 12) en presencia de los compuestos esfingoideos y de la FB<sub>1</sub> tanto en condiciones *in vivo* (6 horas) como *in vitro* (15') para comparar sus efectos en la actividad de cinasas de MBP. Los geles fueron teñidos y expuestos como se describe en el Apéndice.

Tabla 12. Composición de la mezcla general de la reacción de fosforilación de MBP efectuada por las FCs expuestas *in vivo* a los compuestos esfingoideos durante 6 o 24 horas

Tubo	Buffer de fosforilación	10 μM FB <sub>1</sub> , SN, PS o CE ( <i>in vitro</i> )	10 μM FB <sub>1</sub> , SN, PS o CE ( <i>in vivo</i> )	H <sub>2</sub> O	Fracción citosólica	Vol total	Buffer de digestión
A	*	-	-	*	10 μg	8 μL	16 μL
B-E	*	✓	-	*	10 μg	8 μL	16 μL
F-I	*	-	✓	*	10 μg	8 μL	16 μL

\* La cantidad añadida está basada en el cálculo del decaimiento del radioisótopo con respecto al tiempo

De igual forma, se evaluó el efecto de los compuestos de estudio en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos en condiciones *in vivo* durante 24 horas, comparándolas nuevamente con las mismas condiciones *in vitro*.

#### 6.5.4. Efecto de los inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP expuestas a la FB<sub>1</sub> y compuestos esfingoideos

Se realizaron experimentos con inhibidores de fosfatasa para evaluar la posible regulación de cinasas de MBP por fosfatasa. Para ello se evaluó el efecto de diferentes inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP.

##### 6.5.4.1. Efecto de dos mezclas diferentes de inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP de las FCs expuestas a FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoideos.

En este ensayo se evaluaron dos mezclas de inhibidores de fosfatasa diferentes cuyas composiciones se resumen en la Tabla 13. Las FCs fueron incubadas en la mezcla general de reacción (Tabla 14) y después de su fosforilación, se siguieron los procedimientos descritos en el Apéndice.

Tabla 13. Composición de las mezclas de inhibidores de fosfatasa.

	Inhibidores A			Inhibidores B		
	Ác. okadaico	NaF	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Ác. okadaico	NaF	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
Conc. Stock	100 µM	500 mM	5 mM	100 µM	500 mM	5 mM
Conc. Requerida	1 µM	20 mM	200 µM	1 µM	20 mM	1 mM
Para 10 µL	0.1 µL	0.4 µL	0.4 µL	0.1 µL	0.4 µL	2 µL

Tabla 14. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación de MBP en presencia de compuestos esfingoideos e inhibidores de fosfatasa

Tubo	Buffer de fosforilación	FB <sub>1</sub> , SN, PS o CE	Concentración	Inh A	Inh. B	H <sub>2</sub> O	Fracción citosólica	Vol final	Buffer de digestión
A-E (1-3)	*	✓	10 µM	0.9 µL	2.5 µL	*	10 µg	8 µL	16 µL

\* La cantidad añadida está basada en el cálculo del decaimiento del radioisótopo con respecto al tiempo

##### 6.5.4.2. Efecto de dos mezclas diferentes de inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP de las FCs expuestas a PS y CE.

Por otro lado, se evaluó la especificidad de las fosfatasa que defosforilaron al sustrato de las cinasas de MBP. Para comparar el efecto de diferentes inhibidores de fosfatasa se realizaron experimentos independientes en los que a las FCs tratadas con 10

$\mu\text{M}$  de PS o CE se les añadió la mezcla de inhibidores de fosfatasa (B) o únicamente  $1 \mu\text{M}$  de ácido okadaico como se indica en la Tabla 15.

Tabla 15. Composición de la mezcla de reacción de fosforilación de MBP en presencia de PS o CE e inhibidores de fosfatasa

Tubo	Buffer de fosforilación	FB <sub>1</sub> , SN, PS o CE	Concentración	Ác. okadaico	Inh. B	H <sub>2</sub> O	Fracción citosólica	Vol final	Buffer de digestión
A-E (1-3)	*	✓	$10 \mu\text{M}$	$0.1 \mu\text{L}$	$2.5 \mu\text{L}$	*	$10 \mu\text{g}$	$8 \mu\text{L}$	$16 \mu\text{L}$

\* La cantidad añadida está basada en el cálculo del decaimiento del radioisótopo con respecto al tiempo

Después de su fosforilación, las muestras fueron tratadas con los mismos procedimientos planteados en los experimentos anteriores (Ver punto 6.5 y las secciones anteriores en el Apéndice).

Todos los procedimientos fueron repetidos de 2 a 4 veces con al menos una fracción citosólica. En algunos casos sólo se muestra un experimento representativo o los valores de la media de dos experimentos, ya que en algunos casos los carriles del gel mostraron una mayor o menor cantidad de proteína y, al no realizar su normalización, no se consideraron en los resultados.

## 7. RESULTADOS

---

---

### 7.1. Cuantificación de proteínas:

La concentración de proteína en los extractos celulares se determinó inicialmente por la técnica de Lowry-Peterson sin precipitación con TCA. No obstante, al detectarse interferencias causadas por un reactivo contenido en el buffer de homogenización (posiblemente el NaF), se desarrollaron diferentes técnicas y modificaciones de algunas de éstas para evitar dicha interferencia y cuantificar adecuadamente el contenido de proteína de las diferentes fracciones citosólicas (FCs) obtenidas. En la Tabla 12 se muestra la proteína cuantificada con distintos procedimientos a una misma FC de embriones de maíz, para que los resultados fueran comparables entre sí. El valor de referencia para la cuantificación de proteína fue el establecido por el análisis densitométrico de diferentes concentraciones de proteínas de membrana plasmática (10-100  $\mu\text{g}$ ) separados en geles SDS y teñidos con azul de Coomassie y cuyos valores absolutos se determinaron antes de aplicarse al gel por el procedimiento de Lowry en el que no hubo interferencia alguna. Como se puede apreciar en la Tabla 12, dependiendo de la técnica utilizada, se obtuvieron valores diferentes de concentración de proteínas en los 10  $\mu\text{L}$  de FC. Al comparar los datos experimentales con el valor de referencia obtenido de proteínas de membrana plasmática, se observó que la determinación de Lowry-Peterson precedida de una reacción de precipitación de las FCs con etanol absoluto y acetona en una relación (v:v) de 1:5 fue el que dio los resultados más parecidos al valor de referencia (proteínas de membrana plasmática). Por ello, se decidió combinar estas dos técnicas para cuantificar el contenido proteico de las FCs. Primero se determinaron las concentraciones de proteína por el método de Lowry-Peterson de las FCs precipitadas con etanol-acetona 1:5 (v:v) y, posteriormente, se aplicaron 20  $\mu\text{g}$  de las proteínas citosólicas a geles SDS-PAGE para comparar el patrón con un estándar de proteínas membranales de 20  $\mu\text{g}$ . Cuando se consideró necesario, se procedió a calibrar el contenido proteico en geles SDS-PAGE, por comparación con el valor de referencia.

Tabla 16. Comparación entre diferentes procedimientos de cuantificación de proteínas de las FCs

PROCEDIMIENTO	$\mu\text{g}$ de proteína en 10 $\mu\text{L}$ de FC
KIT ESL (Exact, Sensitive, Low interference, Roche Diagnostics GMBH)	*
Densitometría en papel Whatman 3MM (Ghosh <i>et al.</i> , 1988)	15
Bradford (considerando blanco)	31.2
Bradford (sin considerar blanco)	54.6
Electroforesis en gel de SDS y comparación densitométrica con vesículas membranales	112.9
Lowry-Peterson (pp con Et-OH-acetona (1:5, v/v) y solubilización con 1% SDS)	162.4
Lowry-Peterson (pp con Et-OH absoluto-acetona (1:5, v/v) y solubilización con H <sub>2</sub> O)	191.8
Lowry-Peterson (considerando blanco)	*
Lowry-Peterson (sin considerar blanco)	322

\*Los blancos presentaron una absorbancia muy alta, cercana a la de las muestras con proteína.

## 7.2 Separación electroforética de las proteínas de las FCs de embriones de maíz

Para la separación electroforética de las proteínas se empleó la técnica de Schägger y Von Jagow (1987). En la figura 8, se muestra la curva de calibración obtenida con la movilidad relativa (Mr) de proteínas de referencia preteñidas y el logaritmo de sus respectivas masas moleculares (log PM); en esta figura se observa una relación lineal entre los dos parámetros y una buena separación de proteínas con masas moleculares de entre 10 y 100 kDa.

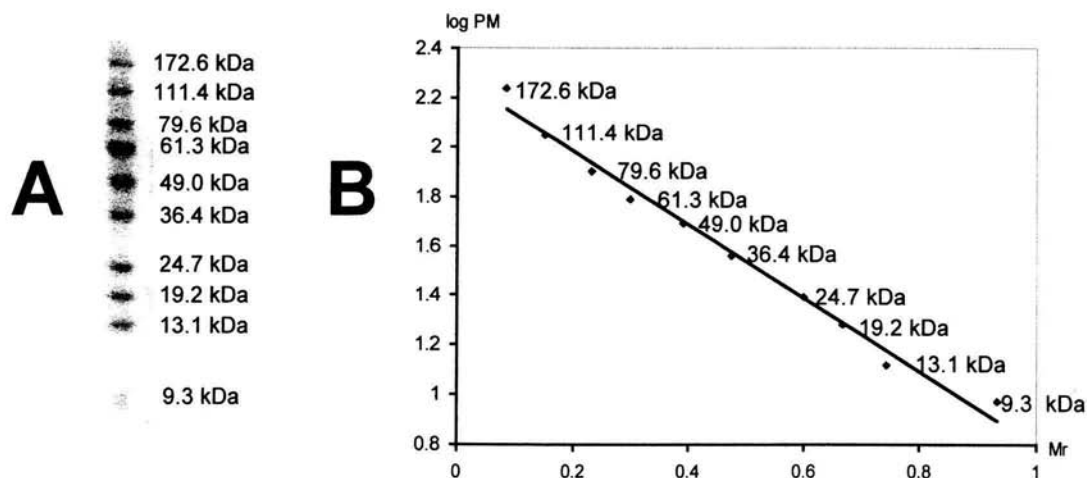


Figura 8. Electroforesis de proteínas de referencia preteñidas (SeeBlue, Invitrogen), en un gel desnaturalizante de 1.0 mm de grosor (A) y la respectiva relación entre movilidad relativa y peso molecular de las proteínas (B).

### **7.3. Optimización de condiciones de fosforilación de la MBP.**

Para determinar la actividad de MAP cinasas de embriones de maíz por efecto de la  $FB_1$  y compuestos esfingoideos, fue necesario optimizar las condiciones de fosforilación de la MBP y mejorar su visualización en las autorradiografías. Por ello, se evaluaron diferentes relaciones entre cantidades de las FCs, de la MBP y de las concentraciones de ATP.

#### **7.3.1. Relación MBP/FC óptima para las reacciones de fosforilación.**

El efecto de la relación entre la MBP y la fracción citosólica se evaluó con la finalidad de elegir la relación adecuada para los experimentos posteriores. Se estudiaron 5 diferentes relaciones MBP/FC (peso/peso) en un intervalo de 0.14 a 0.5, como se muestra en la Fig. 9. Para obtener estas relaciones se incrementó la cantidad de proteínas del extracto y se mantuvo constante la cantidad de MBP (Fig. 9A). El patrón de fosforilación de la proteína sustrato (Fig. 9B) muestra una máxima fosforilación en la relación MBP/FC de 0.5 y disminuye al decrementar la relación. Dicho patrón se obtuvo en varias preparaciones de fracciones citosólicas independientes (Fig. 9C), en donde se observó un descenso muy marcado entre las diferentes relaciones MBP/FC. Por esta razón se eligió la relación MBP/FC de 0.5. En este experimento también se observó la fosforilación de proteínas de las FCs con masas moleculares de 63, 76 y 100 kDa, cuyo marcaje se pudo apreciar mejor en ausencia de la MBP sustrato (carril ubicado en el extremo derecho del gel), probablemente debido a una mayor disponibilidad del ATP.

#### **7.3.2. Efecto de la dilución isotópica de $[\gamma^{32}P\text{-ATP}]$ con ATP sin marcaje radioactivo.**

El intervalo de concentraciones de ATP para evaluar el efecto de éste en la fosforilación de la MBP sustrato fue de 0 a 150  $\mu\text{M}$ . Como se muestra en la Figura 10, las diferencias observadas en la fosforilación de la MBP (Fig. 10B) no fueron causadas por el cargado de las proteínas durante el proceso electroforetico (Fig. 10A), ya que en todos los carriles del gel puede verificarse que se cargó la misma cantidad de proteínas de los extractos. En el análisis densitométrico de varios experimentos independientes (Fig. 10C) se observó una máxima fosforilación de MBP a concentraciones de 10 a 50  $\mu\text{M}$  de ATP. Sin embargo, la concentración elegida para los experimentos posteriores fue de 50  $\mu\text{M}$ , pues además de ser la concentración más reportada para medir actividad de MAP cinasas, nos proporciona una mejor señal, lo que permite evaluar de una manera más clara las diferencias de fosforilación causadas por efecto de los compuestos en estudio.

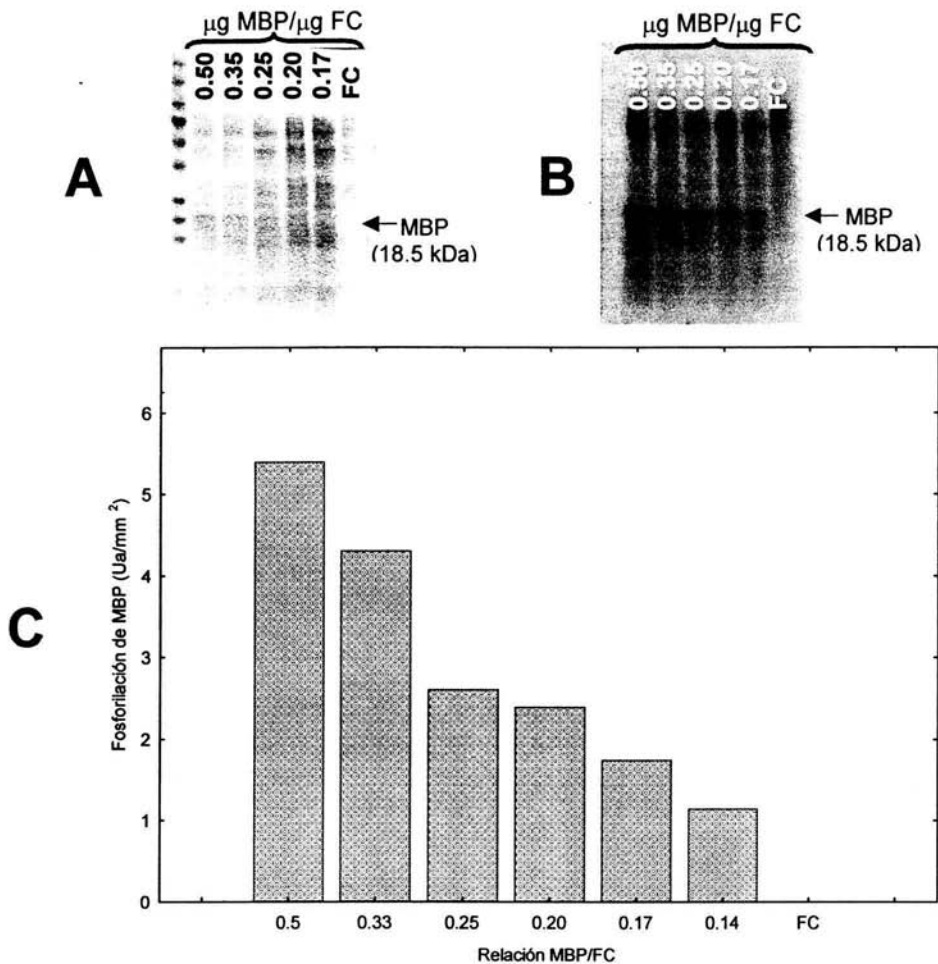


Figura 9. Efecto de la variación de la relación MBP/FC sobre el nivel de fosforilación del sustrato de cinasas de MBP de embriones de maíz. (A) Separación electroforética de diferentes cantidades de proteínas del extracto: 7, 10.5, 14, 21 y 24.5  $\mu\text{g}$ , que corresponden a las relaciones MBP/FC (p/p) de 0.50, 0.35, 0.25, 0.20 y 0.17 respectivamente, (B) Autorradiografía expuesta del gel mostrado en (A) y (C) análisis densitométrico de lecturas obtenidas en el Phosphor Imager a partir de autorradiografías de distintos gels. FC indica únicamente la adición de las proteínas al buffer de reacción en ausencia de la MBP. Cada barra representa el promedio de dos experimentos independientes muy similares.

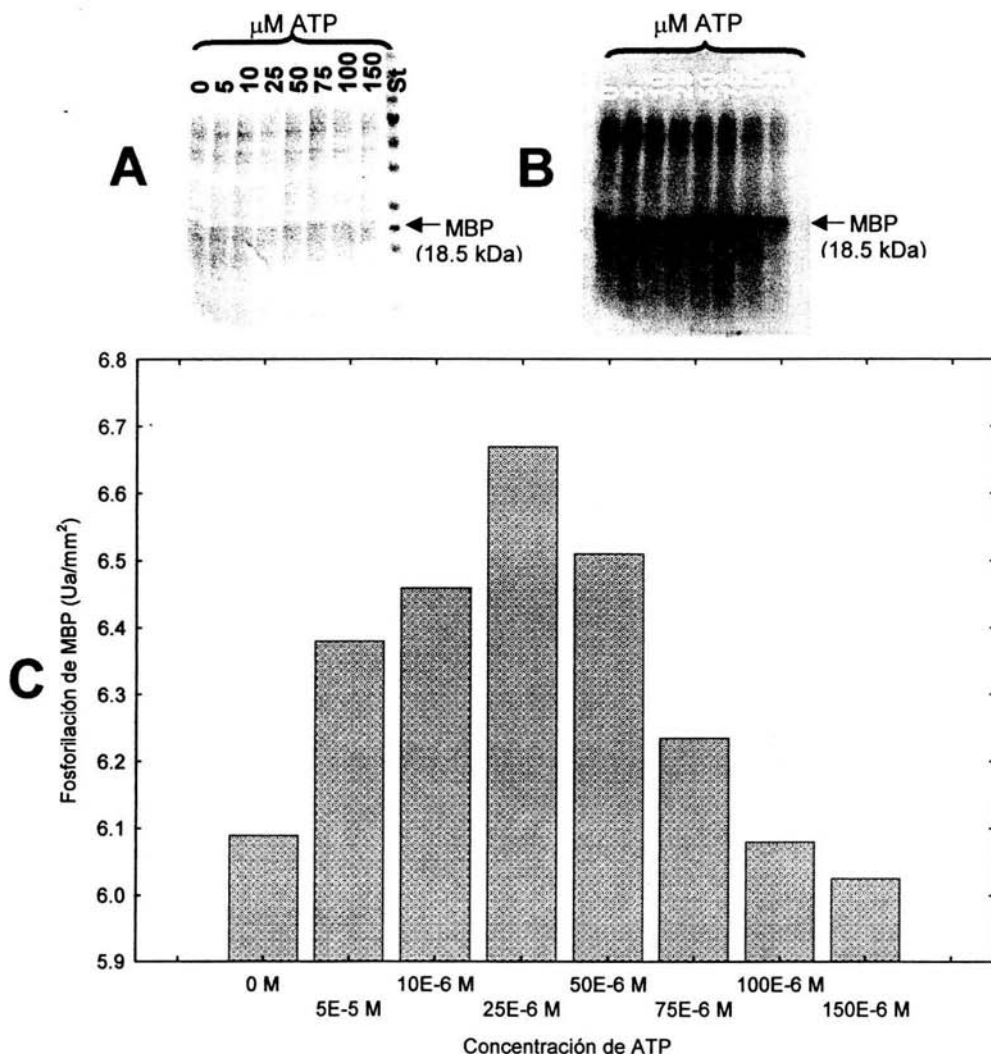


Figura 10. Efecto de la dilución isotópica de  $[\gamma^{32}\text{P-ATP}]$  con ATP sin marcaje radioactivo. (A) Separación electroforética y tinción con azul de Coomassie de 7  $\mu\text{g}$  de proteínas de los extractos tratados con diferentes concentraciones de ATP sin marcaje radioactivo a una concentración fija de  $[\gamma^{32}\text{P-ATP}]$  (1  $\mu\text{Ci}$ ); (B) autorradiografía del gel mostrado en (A) y (C) análisis densitométrico de las lecturas obtenidas con el Pospón Imager de diferentes ensayos independientes. Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes muy similares.

### 7.3.3. Actividad de cinasa presente en FCs de embriones de maíz en germinación.

Con objeto de explorar la actividad de cinasas de proteínas de FCs en condiciones de fosforilación para MAP cinasas, se diseñó un experimento en el que éstas se incubaron con



tres diferentes tipos de proteínas sustrato:  $\alpha$ -caseína de leche bovina, histona tipo III de becerro y proteína básica de la mielina (MBP) de cerebro bovino. Los resultados se muestran en la Fig. 11 en la que se observó que los tres tipos de proteína fueron fosforiladas, lo que indica que las FCs contienen múltiples tipos de cinasas que llevan a cabo la reacción de fosforilación.

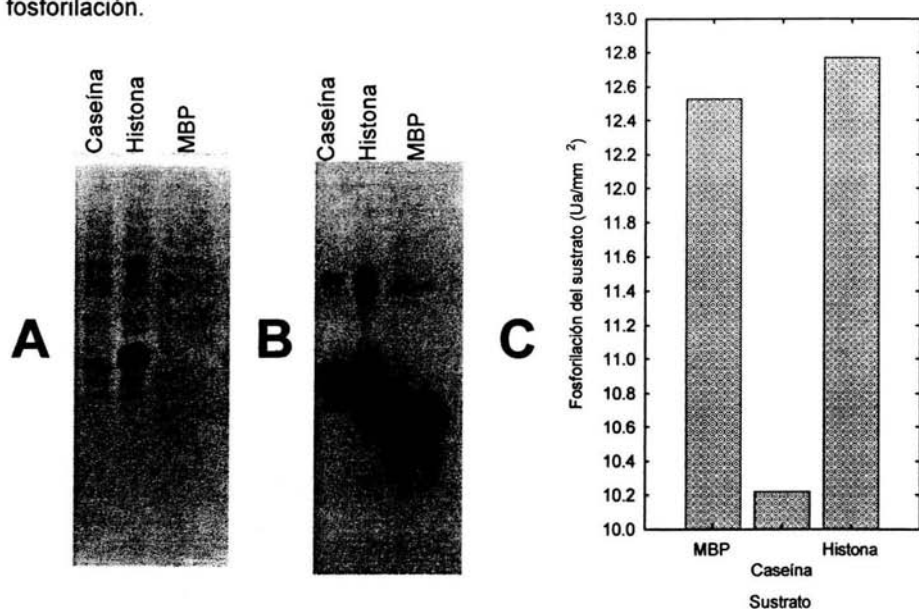


Figura 11. Actividad de cinasa presente en FCs de embriones de maíz en germinación. (A) Separación electroforética y tinción con azul de Coomassie de 10  $\mu$ g de fracción citosólica tratada con diferentes sustratos de cinasas: MBP o  $\alpha$ -caseína o histona; (B) autorradiografía del gel mostrado en (A) y (C) análisis densitométrico de las lecturas obtenidas con el Phosphor Imager. Se muestra un experimento representativo de 2 experimentos independientes.

#### 7.4. Efecto del tiempo de exposición *in vitro* de los compuestos esfingoideos o la FB<sub>1</sub> sobre la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz.

Para investigar la respuesta de los embriones de maíz contra uno de sus patógenos naturales, se estudió el efecto de la toxina FB<sub>1</sub> en la actividad de cinasas de MBP. Ya que la FB<sub>1</sub> interrumpe la biosíntesis de esfingolípidos alterando los niveles endógenos de los compuestos esfingoideos celulares (Merrill, 2002), también se estudiaron los efectos de la SN, PS y CE en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz.

Los experimentos *in vitro* se refieren a la exposición de las FCs de embriones de maíz a la FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoideos durante su incubación en el buffer de fosforilación.

Primeramente, se analizó qué efecto tenían la  $FB_1$  y los compuestos esfingoideos esfinganina (SN), fitoesfingosina (PS) y ceramida (CE) en la actividad de fosforilación de MBP por las FCs de embriones de maíz embebidos 24 h (experimento *in vitro*). Los tiempos de exposición a los compuestos fueron de 2, 5, 10, 20 y 30 min, como se indica en la Figura 12. En las Figuras 12A y 12A' se muestran los geles teñidos con azul de Coomassie en los que se separaron electroforéticamente las FCs tratadas con los diferentes compuestos de estudio en los tiempos indicados en la parte superior de las figuras, así como las FCs que fueron expuestas únicamente al buffer de reacción, en los tiempos mencionados anteriormente (condiciones control), para emplearlas como referencia en cada tiempo de exposición. La tinción de los geles mostró que la cantidad de proteína cargada en todos los carriles fue la misma. Los análisis densitométricos de la Fig. 12C y 12D fueron obtenidos de las lecturas de la fosforilación de la MBP sustrato de las autorradiografías mostradas en las Figuras 12B y 12B' de los geles mostrados en la Fig. 12A y A', respectivamente. En la Fig. 12C, la fosforilación de la MBP se expresó en unidades de densidad óptica, mientras que en el análisis densitométrico de la Fig. 12 D, la fosforilación se expresó en porcentaje tomando como referencia la condición control para cada tiempo de exposición y considerándola como el 100% para todos los tiempos analizados, de modo que los valores mayores a éste indican una activación de cinasas de MBP por efecto de los compuestos y valores menores al 100% indican una inhibición.

Del análisis densitométrico mostrado en la Fig. 12C, se puede observar una tendencia general decreciente en el nivel de fosforilación de la MBP. No obstante, se pueden apreciar diferencias en los distintos tratamientos. En condiciones control, la MBP estaba inicialmente fosforilada y entre 2 y 30 min esta fosforilación fue disminuyendo gradualmente. Tanto la curva control como las obtenidas a partir de los tratamientos con  $FB_1$  y PS, presentaron cinéticas similares entre sí durante el transcurso de la incubación, a diferencia de los tratamientos con SN y CE cuyas tendencias fueron las más diferentes, pues la SN produjo un ligero incremento en el nivel de fosforilación entre los 2 y 30 min y la CE tuvo un efecto constante durante la incubación.

El efecto del tiempo de exposición de la  $FB_1$  y de los compuestos esfingoideos en el nivel de fosforilación de la MBP se puede apreciar mejor en el análisis densitométrico de la Fig. 12D, el cual está expresado en porcentajes con respecto al control. En la figura se observa que aún cuando los compuestos de estudio producen un menor nivel de fosforilación

de la MBP con respecto al control, ésta tiende a incrementar en el transcurso de la incubación, excepto en presencia de PS en el que el nivel de fosforilación permaneció prácticamente constante entre los 2 y 30 min.

Estos efectos se observaron en condiciones de igual cantidad de proteína expuesta, por lo que se descarta la probabilidad de que fueran las diferencias en la cantidad de proteína lo que explicara el cambio en el patrón de fosforilación de la MBP de las FCs tratadas con los diferentes compuestos de estudio a los diferentes tiempos.

#### **7.5. Efecto de la concentración de la FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoideos sobre la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz.**

Para evaluar el efecto de la concentración de la FB<sub>1</sub> y de los compuestos esfingoideos sobre la actividad de cinasas de MBP de las FCs, se realizó un experimento dosis-respuesta. En dicho experimento, las fracciones citosólicas obtenidas a partir de embriones de maíz embebidos durante 24 horas se expusieron *in vitro* a concentraciones en un intervalo de 1 nM a 10 µM de los distintos compuestos en estudio (FB<sub>1</sub>, SN, PS y CE) durante 15 minutos. En la Fig. 13A y 13A' se muestran los geles teñidos con azul de Coomassie, en los que se separaron electroforéticamente las FCs tratadas con las diferentes concentraciones de los compuestos. En la Fig. 13A se muestran las FCs tratadas con FB<sub>1</sub> o SN y en la Fig. 13A' las FCs tratadas con PS o CE. En ambos geles se separaron además FCs que fueron expuestas únicamente al buffer de reacción durante 15 minutos, para considerarlas como controles. Los geles de las dos figuras muestran un contenido proteico similar en todos los carriles que los componen, lo que asegura que los diferentes patrones observados en la fosforilación de la MBP sustrato, mostrados en las Figuras 13B y 13B', dependen exclusivamente del tratamiento aplicado a las FCs. Estas últimas figuras corresponden a las autorradiografías que fueron expuestas a los geles anteriormente mostrados y en ellos se pueden apreciar diferencias en el nivel de fosforilación de la MBP. Sin embargo, para comparar las diferencias de una manera cuantitativa, se determinó la densidad de las bandas de la MBP fosforiladas en el Phosphor Imager y se calcularon los porcentajes de actividad de cinasas de MBP correspondientes con base en la condición control, que fue empleada como referencia (100%). Estos datos se muestran en el análisis densitométrico de la Fig. 13C.

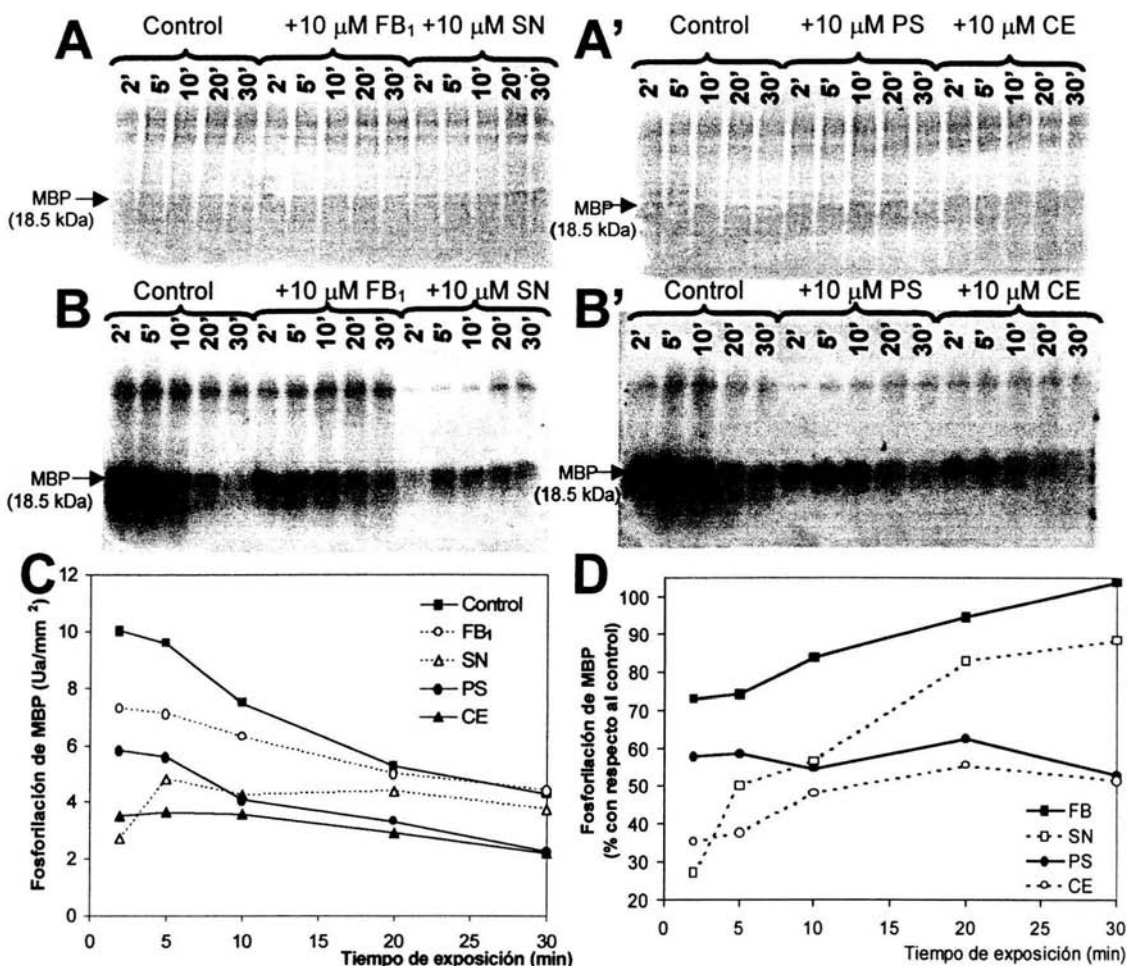


Figura 12. Efecto del tiempo de exposición *in vitro* de la FB<sub>1</sub> y de los compuestos esfingoideos en la actividad de cinasas de embriones de maíz. (A) Geles teñidos con azul de Coomassie, en los que se realizó la separación electroforética de las FCs de embriones de maíz incubadas en el buffer de fosforilación en presencia de 10  $\mu$ M de FB<sub>1</sub> o 10  $\mu$ M de SN (A), o 10  $\mu$ M de PS o 10  $\mu$ M de CE (A') a diferentes tiempos de exposición (2', 5', 10', 20' y 30'). (B) y (B') Autorradiografías de los geles mostrados en (A) y (A') respectivamente. (C y D) Análisis densitométricos obtenidos de las lecturas de la fosforilación de la MBP sustrato de las autorradiografías mostradas en las Figuras 12B y 12B' de los geles mostrados en la Fig. 12A y A', respectivamente. En la Fig. 12C, la fosforilación de la MBP se expresó en unidades de densidad óptica, mientras que en el análisis densitométrico de la Fig. 12D, la fosforilación se expresó en porcentaje tomando como referencia la condición control para cada tiempo de exposición y considerándola como el 100% para todos los tiempos analizados. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Los resultados indican los siguientes efectos: a) La  $FB_1$  activó ligeramente cinasas de MBP en concentraciones entre 1 nM y 1  $\mu$ M, presentándose el máximo de actividad a 100 nM; y las inhibió a concentraciones mayores como 10  $\mu$ M. b) El efecto de la SN sobre la actividad de las cinasas de MBP de las FCs, fue similar al de la toxina, pues la actividad de las cinasas de MBP presentó una cinética semejante para ambos tratamientos, aunque la SN produjo una menor fosforilación de la MBP que la  $FB_1$  dependiendo de la concentración; la SN activó cinasas de MBP en un intervalo de 1 a 100 nM y las inhibió en concentraciones de 1 y 10  $\mu$ M. c) La PS inhibió cinasas de MBP en todo el intervalo de concentraciones estudiado (1 nM a 10  $\mu$ M); el efecto fue mayor al incrementarse la concentración del compuesto, aunque se presentó una tendencia relativamente constante en un intervalo de concentraciones de 10 nM a 1  $\mu$ M; el tratamiento de las FCs con 10  $\mu$ M de PS produjo la mayor inhibición (30%) de las cinasas de MBP con respecto a los tratamientos con los otros compuestos. d) El tratamiento con CE condujo a la inhibición de cinasas de MBP al mismo nivel para todas las concentraciones empleada, manteniéndose un porcentaje de inhibición alrededor de 20. Debe hacerse notar que la activación máxima fue del 10% (en el caso de 100 nM de  $FB_1$ ) y la inhibición máxima fue del 30% (en el caso de 10  $\mu$ M de PS).

#### **7.6. Comparación de la fosforilación de la MBP *in vivo* e *in vitro*.**

Para evaluar si los efectos de la  $FB_1$  y de los compuestos esfingoideos en la actividad de cinasas de MBP *in vitro* eran comparables con los efectos obtenidos al ser adicionados a los embriones de maíz (*in vivo*), se realizaron ensayos en solución con FCs obtenidas a partir de embriones de maíz embebidos durante 6 h (Fig. 14) y 24 h (Fig. 15).

En la Fig. 14 A se muestra el gel teñido con azul de Coomassie en el que se separaron electroforéticamente las FCs obtenidas de los embriones de maíz embebidos durante 6 horas. Para la exposición *in vivo*, los embriones fueron expuestos a 10  $\mu$ M de  $FB_1$ , SN, PS y CE durante las 6 horas de imbibición y para la exposición *in vitro*, las FCs obtenidas de embriones de maíz embebidos únicamente en agarosa y buffer de imbibición, fueron expuestas durante 15 minutos a los compuestos de estudio en el buffer de reacción. En el gel, se muestra un contenido proteico similar para todos los carriles cargados, lo que descartó que fuera la cantidad de proteínas la responsable de las diferencias apreciadas en la fosforilación de la MBP que se observa en la autorradiografía (Fig. 14B). De igual forma, en el gel se separaron proteínas de las FCs de los embriones de maíz embebidos durante 6 horas en ausencia de los compuestos de estudio, para usarlas como referencia (condiciones

control) en el análisis densitométrico, mostrado en la Fig. 14 C; éste fue obtenido a partir de la densidad de las bandas de la MBP sustrato fosforiladas y realizado en el Phosphor Imager. La condición control se consideró como el 100% y con base en este valor se calcularon los porcentajes de las lecturas obtenidas en el Phosphor Imager de las bandas de MBP fosforiladas por las FCs tratadas con los diferentes compuestos de estudio para ambos tipos de exposición.

Los resultados expuestos en la Fig. 14C indican que los compuestos esfingoides inhibieron cinasas de MBP, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*, si bien el efecto fue mayor en el ensayo *in vitro*. La FB<sub>1</sub> estimuló a la actividad de cinasas de MBP ligeramente cuando los embriones de maíz se expusieron *in vivo* a la toxina. A su vez, se pueden observar diferencias marcadas entre las exposiciones *in vivo* e *in vitro* de los embriones de maíz con cada compuesto estudiado, salvo en el tratamiento con SN en el que la fosforilación de la MBP permaneció casi constante para ambos casos.

En la Fig. 15A, se muestra el gel teñido con azul de Coomassie en el que se separaron electroforéticamente las FCs de los embriones de maíz embebidos durante 24 horas. Para esta exposición *in vivo*, los embriones fueron expuestos a la FB<sub>1</sub>, SN, PS y CE durante las 24 horas de imbibición y para la exposición *in vitro*, las FCs, obtenidas de embriones de maíz embebidos únicamente en agarosa y buffer de imbibición durante el mismo periodo de tiempo, fueron expuestas durante 15 minutos a la FB<sub>1</sub> y los compuestos esfingoides en el buffer de reacción. En el mismo gel, se separaron FCs que no fueron tratadas con compuesto alguno, para considerarlas como condición control. Se verificó que el gel contuviera un contenido proteico similar para todos los carriles cargados, para descartar que la cantidad de proteínas fuera la responsable de las diferencias en la fosforilación de la MBP observadas en la autorradiografía (Fig. 15B). El análisis densitométrico (Fig. 15C) fue obtenido a partir del cálculo en porcentaje de las lecturas realizadas en el Phosphor Imager de la intensidad de las bandas de la MBP sustrato fosforiladas, considerándose a la condición control como el 100% de fosforilación.

Los resultados de la Fig. 15C confirman que la exposición *in vitro* de los embriones de maíz con cualquier compuesto analizado inactiva a las cinasas de MBP desde un 8% con FB<sub>1</sub> hasta un 32% con PS. Al igual que en el experimento anterior, la actividad de cinasas de MBP de las FCs expuestas *in vivo* a la FB<sub>1</sub> y a los compuestos esfingoides fue elevada (comparada con el experimento *in vitro*) y muy cercana al control, pues de los cuatro compuestos en estudio, sólo la PS promovió una ligera inhibición de las cinasas de MBP expuestas *in vivo* durante 6 horas.

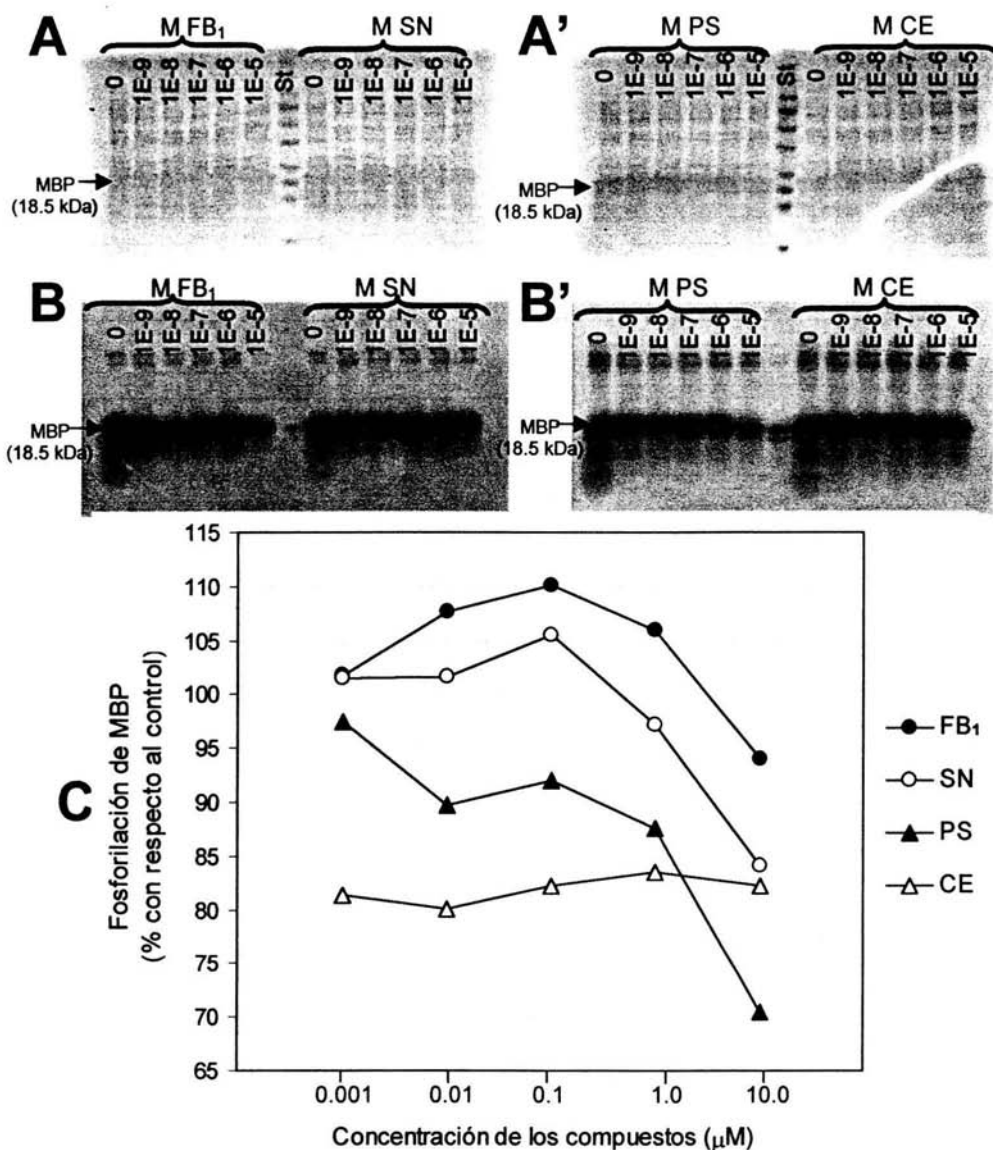


Figura 13. Efecto de la concentración de la FB<sub>1</sub> y de los compuestos esfingoideos en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz. (A) Separación electroforética y tinción con azul de Coomassie de proteínas del extracto tratadas con FB<sub>1</sub> y SN, y (A') con PS y CE durante 15 min, en las concentraciones indicadas en la parte superior de los geles. (B) y (B') Autorradiografías de los geles (A) y (A') respectivamente, y (C) análisis densitométrico de varias lecturas obtenidas del Phosphor Imager, tomando como referencia al patrón de fosforilación de la MBP de las proteínas sin compuestos (100%). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes muy similares.

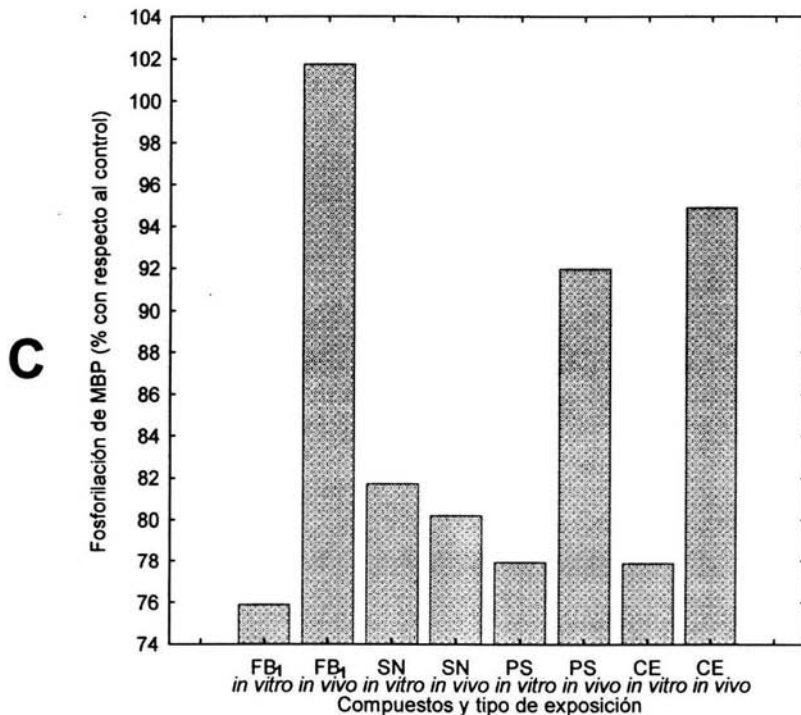
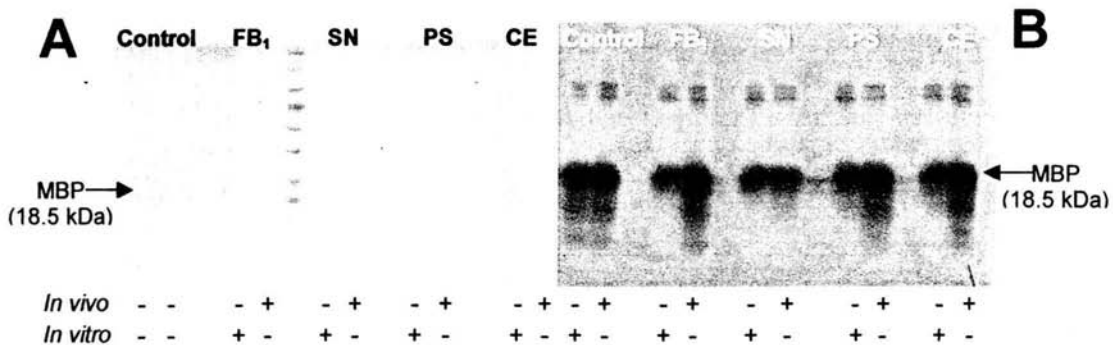


Figura 14. Efecto de la exposición de embriones de maíz *in vivo* o *in vitro* a 10  $\mu$ M de FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoides en la actividad de cinasas de MBP. La exposición *in vivo* se refiere a la imbibición de los embriones de maíz en presencia de la FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoides, mientras que la exposición *in vitro* se refiere a la incubación de las FCs de embriones de maíz en el buffer de fosforilación que contiene a los compuestos de estudio. (A) Para la exposición *in vivo*, los embriones de maíz fueron embebidos durante 6 horas en presencia de la FB<sub>1</sub> y de los compuestos esfingoides, a diferencia del tratamiento *in vitro*, en el que se adicionaron los compuestos de estudio directamente a las fracciones citosólicas e incubadas durante 15 minutos. Posteriormente, las diferentes FCs fueron separadas electroforéticamente en un gel SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie. (B) Autorradiografías de los geles mostrados en (A). (C) Análisis densitométrico de la MBP marcada obtenido con el Phosphor Imager. Se presenta un experimento representativo de un total de 2 experimentos independientes.



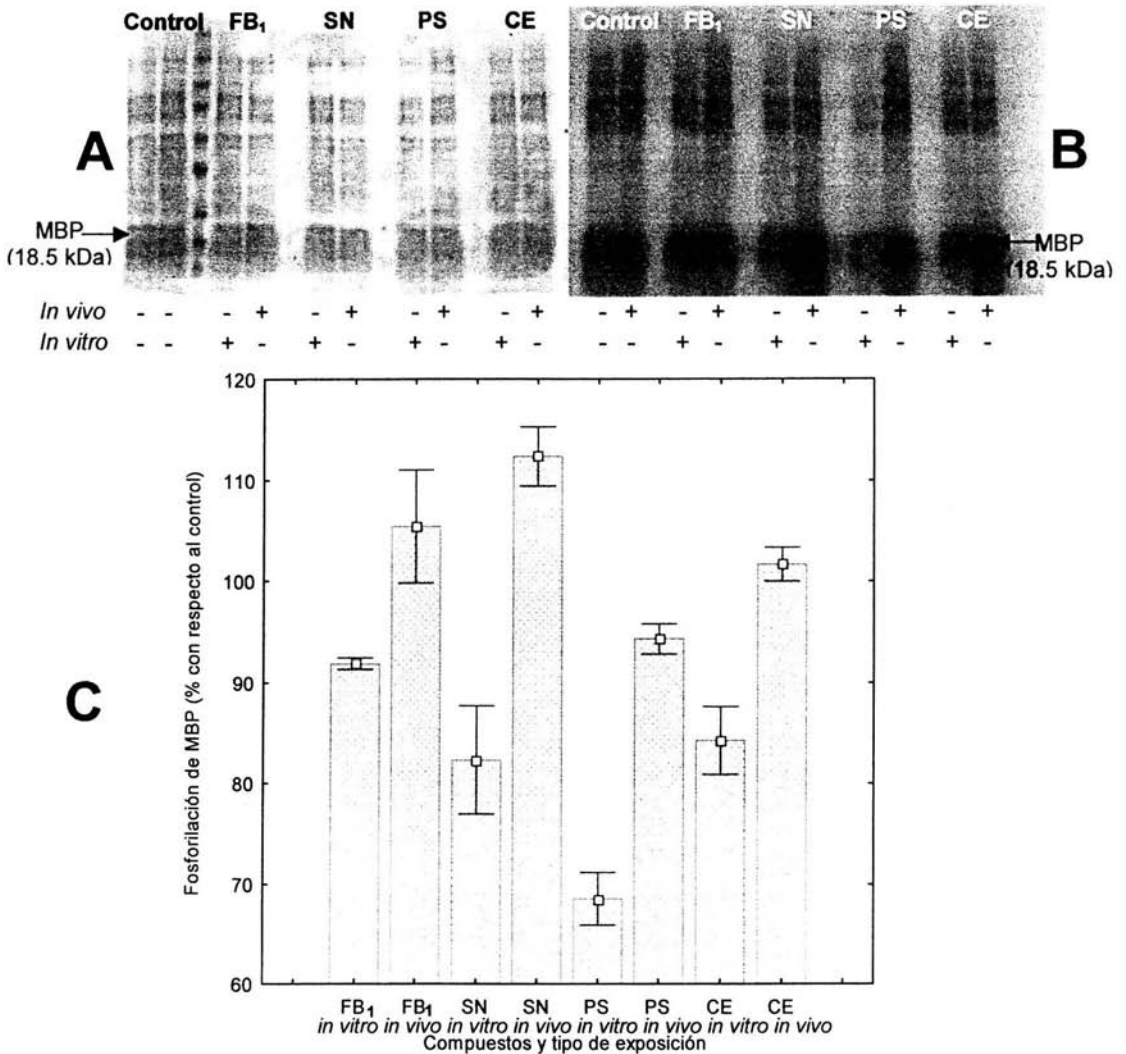


Figura 15. Efecto de la exposición de embriones de maíz *in vivo* e *in vitro* con la FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoides en la actividad de cinasas de MBP. La exposición *in vivo* se refiere a la imbibición de los embriones de maíz en presencia de la FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoides, mientras que la exposición *in vitro* se refiere a la incubación de las FCs de embriones de maíz en el buffer de fosforilación que contiene a los compuestos de estudio. (A) Para la exposición *in vivo*, los embriones de maíz fueron embebidos durante 24 horas en presencia de la FB<sub>1</sub> o de los compuestos esfingoides, a diferencia del tratamiento *in vitro*, en el que se adicionaron los compuestos de estudio directamente a las fracciones citosólicas y puestas en reacción durante 15 minutos. Posteriormente, las diferentes FCs fueron separadas electroforéticamente en un gel SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie. (B) Autorradiografías de los gels mostrados en (A). (C) Análisis densitométrico de las lecturas de la MBP marcada obtenidas del Phosphor Imager. Cada barra representa la media  $\pm$  DS de tres determinaciones independientes.

Una diferencia muy interesante, con respecto al experimento anterior, es que la máxima actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos *in vivo* a los compuestos de estudio, se presentó en el tratamiento con SN, misma sustancia que indujo la máxima inhibición a las 6 horas de exposición *in vivo*.

Con respecto a la actividad de cinasas de embriones de maíz expuestos *in vivo* con FB<sub>1</sub> durante 6 y 24 horas, ésta prácticamente no se modificó, mientras que en los tratamientos de los embriones de maíz *in vivo* con PS y CE se incrementó la actividad de cinasas a las 24 horas con respecto a la de las 6 horas de exposición. Dicho de otra manera, la reducción en la actividad de cinasas por compuestos esfingoideos añadidos *in vivo*, ocurrió en mayor magnitud a 6 h que a 24 h, pero fue menor en todos los casos que la que se observó en las condiciones *in vitro*.

### **7.7. Efecto de los inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP de FCs expuestas *in vitro* a la FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoideos.**

Una forma de evaluar si la FB<sub>1</sub> y compuestos esfingoideos estaban afectando la actividad de fosfatasa *in vitro*, era realizar experimentos con compuestos que inhiben la actividad de estas enzimas. Para ello se realizó un ensayo con FCs obtenidas de embriones de maíz embebidos durante 24 horas, expuestas simultáneamente a 10  $\mu$ M de FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoideos y a una mezcla de inhibidores de fosfatasa durante 15 minutos. En el ensayo se evaluaron dos mezclas de inhibidores de fosfatasa diferentes cuyas composiciones fueron 1  $\mu$ M de ácido okadaico, 200  $\mu$ M de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y 20 mM de NaF, para el referido en las Figs. 16 y 17 como (+ inhA), y de 1  $\mu$ M de ácido okadaico, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y 20 mM de NaF para el referido como (+ inhB).

En la Fig. 16A se muestra el gel teñido con azul de Coomassie en el que se separaron electroforéticamente las FCs tratadas con los compuestos de este estudio (FB<sub>1</sub>, SN, PS y CE) y con las mezclas de inhibidores de fosfatasa. Adicionalmente, se expusieron FCs únicamente al buffer de reacción en presencia o no de los inhA ó B durante 15 minutos, para considerarlas como controles. El gel teñido muestra un contenido proteico similar en todos los carriles que lo componen, lo que demuestra que los diferentes patrones observados en la autorradiografía sobre la fosforilación de la MBP sustrato (Fig. 16B) dependen exclusivamente del tratamiento aplicado a las FCs. Para comparar las diferencias en el nivel de fosforilación de la MBP, se determinó su densidad en el Phosphor Imager y se calcularon los porcentajes de actividad correspondientes.

En la Fig. 16C se muestran los valores de fosforilación de la MBP en todas las condiciones control. El nivel de fosforilación en la MBP de la FC control incubada en la mezcla de inhibidores de fosfatasa mostró un incremento del 10% con respecto al control; este resultado indica que en las FCs de los embriones de maíz la actividad basal de cinasas está siendo afectada por fosfatasa. En este mismo panel se observa que la FB<sub>1</sub>, SN, PS y CE indujeron un decremento en el nivel de fosforilación de la MBP (como se ha descrito en

los experimentos anteriores), lo que sugería que esta disminución era producida por la activación de fosfatasa que afectaban la actividad de las cinasas de proteína. Cuando a las FCs con compuestos esfingoideos se les incubó con las dos mezclas de inhibidores y se determinó la fosforilación de MBP (Figs. 16B, D), se encontró que las FCs expuestas a los inhibidores de fosfatasa y a la FB<sub>1</sub> y SN incrementaron un 5% y 8% el nivel de fosforilación de la MBP con respecto a las FCs menos inhibidores, lo cual implica que la FB<sub>1</sub> y SN condujeron a una activación de fosfatasa en esa proporción; asimismo, se observó que las dos mezclas de inhibidores de fosfatasa produjeron un nivel similar en la fosforilación de la MBP tanto para FB<sub>1</sub> y SN. Por otro lado, se observó que la PS estimuló una actividad máxima de fosfatasa de ≈40% y que la CE lo hizo en un 13%; para estos compuestos sí se observó una diferencia marcada en el nivel de fosforilación de la MBP entre las dos mezclas de inhibidores de fosfatasa, siendo 10% mayor la fosforilación en presencia de la mezcla B (10%) que en presencia de la mezcla A.

Por otro lado, para evaluar si las fosfatasa inactivaban de forma específica a las cinasas de las FCs en presencia de PS o CE, se realizó un experimento en el que a las FCs se les añadía simultáneamente 10 μM de PS o CE y 1 μM ácido okadaico o la mezcla de inhibidores B.

En la Fig. 17A se muestra el gel teñido con azul de Coomassie en el que se separaron electroforéticamente las FCs tratadas con PS o CE y los inhibidores de estudio. Se incluyeron FCs expuestas únicamente al buffer de reacción en presencia o no de los inhibidores durante 15 minutos, para considerarlas como controles. El gel teñido muestra un contenido proteico similar en todos los carriles que lo componen, lo que explica que los diferentes patrones observados en la autorradiografía sobre la fosforilación de la MBP sustrato (Fig. 17B), dependen exclusivamente del tratamiento aplicado a las FCs. Para comparar las diferencias en el nivel de fosforilación de la MBP, se determinó su densidad en el Phosphor Imager y se calcularon los porcentajes de actividad fosforilante correspondientes, comparándolos con las condiciones controles respectivas (sin mezcla de inhibidores de fosfatasa); (Fig. 17C).

De forma similar al experimento anterior, el nivel de fosforilación en la MBP de las FCs control en presencia de los inhibidores, aumentó un 10% con respecto al control. Asimismo, se demostró en el análisis densitométrico que la PS activaba principalmente fosfatasa sensibles al ácido okadaico, dado que el nivel de fosforilación de la MBP se incrementó 40% con respecto a su control. La diferencia en el nivel de fosforilación entre las FCs tratadas con PS y los dos tipos de inhibidores fue del 20%. La CE, al igual que la PS, activó en mayor magnitud fosfatasa sensibles al ácido okadaico; pues el incremento en el nivel de fosforilación con respecto a su control fue del 35% y la diferencia con el producido por la mezcla de inhibidores fue del 23%.

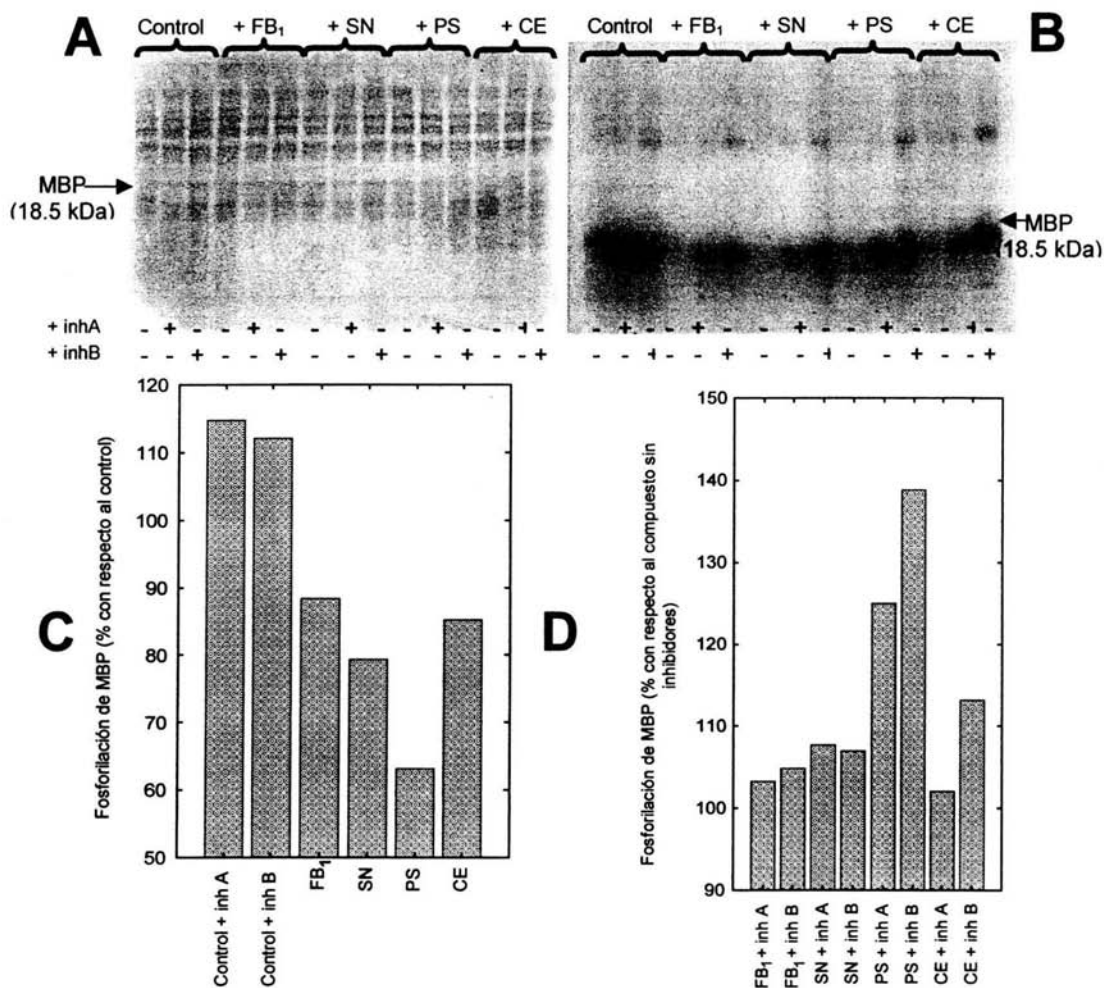


Figura 16. Efecto de los inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP de FCs de embriones de maíz expuestas *in vitro* a FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoideos. (A) Geles teñidos con azul de Coomassie en los que se realizó la separación electroforética de las FCs expuestas *in vitro* a 10  $\mu$ M de FB<sub>1</sub>, SN, PS y CE y a la mezcla de inhibidores de fosfatasa durante 15 min. (B) Autorradiografía expuesta al gel mostrado en (A) y (C) análisis densitométrico en el que se tomó como referencia a la fosforilación de la MBP de la condición control en ausencia de los inhibidores (100%) para todas las condiciones analizadas. (D) Análisis densitométrico en el que se tomó como referencia el nivel de fosforilación de la MBP de las FCs tratadas con la FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoideos en ausencia de los inhibidores (100%). InhA se refiere a la mezcla compuesta por 1  $\mu$ M de ácido okadaico, 200  $\mu$ M de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y 20 mM de NaF, e inhB se refiere a la mezcla compuesta por 1  $\mu$ M de ácido okadaico, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y 20 mM de NaF. Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes muy similares.

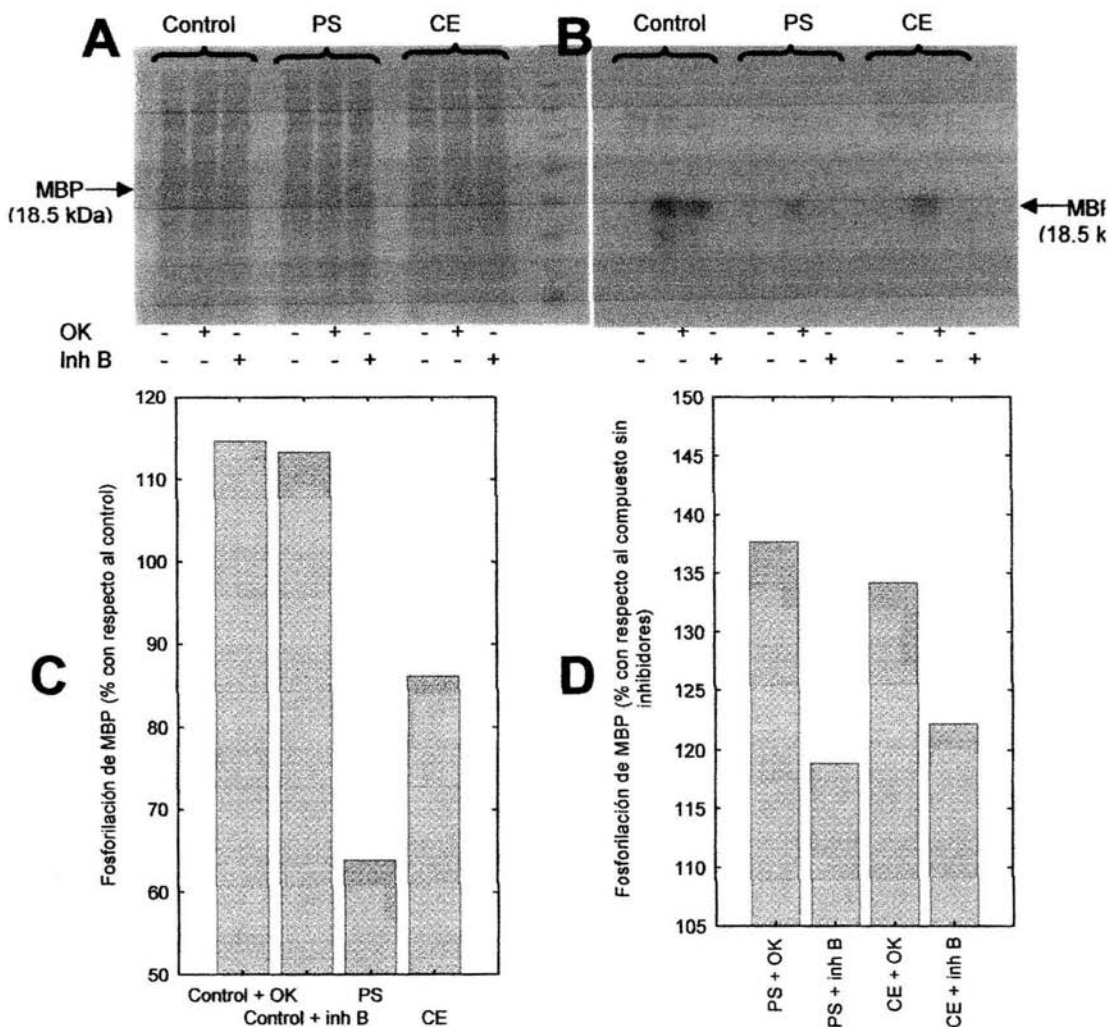


Figura 17. Efecto de los inhibidores de fosfatasa en el nivel de fosforilación de la MBP de FCs de embriones de maíz expuestas *in vitro* a PS o CE. (A) Geles teñidos con azul de Coomassie en los que se realizó la separación electroforética de FCs expuestas *in vitro* a 10  $\mu\text{M}$  de PS o CE y a los inhibidores de fosfatasa durante 15 min. (B) Autorradiografía expuesta al gel mostrado en (A) y; (C) Análisis densitométrico en el que se tomó como referencia a la fosforilación de la MBP de la condición control en ausencia de los inhibidores (100%) para todas las condiciones analizadas. (D) Análisis densitométrico en el que se tomó como referencia el nivel de fosforilación de la MBP de las FCs tratadas con PS o CE en ausencia de los inhibidores (100%). OK se refiere a la adición de 1  $\mu\text{M}$  de ácido okadaico a las FCs, e inhB a la mezcla compuesta por 1  $\mu\text{M}$  de ácido okadaico, 1 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y 20 mM de NaF. Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes muy similares.

### 8.1. Definición de los parámetros óptimos de la fosforilación de la MBP.

Entre los ensayos más empleados para detectar actividad de MAP cinasas y que emplean a la MBP como sustrato *in vitro* se encuentran: a) ensayos en geles de actividad, que se fundamentan en la separación electroforética de proteínas de los extractos en geles SDS-PAGE polymerizados junto con la MBP sustrato, con una subsecuente renaturalización de las MAP cinasas en el mismo gel (Gotoh *et al.*, 1990; Suzuki y Shinshi, 1995; Usami *et al.*, 1995; Zhang y Klessig, 1997) y b) ensayos en solución, en los que se inmunoprecipitan MAP cinasas reconocidas por anticuerpos específicos y, posteriormente, estas proteínas inmunoprecipitadas son puestas a reaccionar en un buffer que contiene a la MBP sustrato (Zhang y Klessig, 1997). Este último ensayo fue el utilizado en el presente trabajo, aunque sin efectuar la reacción de inmunoprecipitación, ya que se quería hacer una exploración general de la capacidad fosforilante de la MBP por las FCs de los embriones de maíz. Adicionalmente, se han caracterizado pocas MAP cinasas de maíz a nivel molecular y sus funciones no están bien definidas (Hardin y Wolniack, 1998; Berberich *et al.*, 1999). Por consiguiente, al no disponer de anticuerpos específicos que reconocieran MAP cinasas de maíz y al no utilizar el ensayo en gel, la fosforilación de la MBP detectada fue efectuada por la actividad de todas las cinasas de MBP presentes en los embriones de maíz.

Debido a que el ensayo en solución implica la fosforilación de MBP por cinasas de proteínas presentes en la FC, pudiendo haber varias de estas cinasas, era importante establecer cuál era la cantidad óptima de extracto que fosforilaba mejor una cantidad fija de MBP y que permitiera su clara visualización en las autorradiografías. La mejor señal resultó ser la obtenida con una relación de 0.5, pues se observó que si se disminuía la relación MBP/FC, la fosforilación de la MBP disminuía.

Igualmente se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de ATP, ya que en la literatura se ha reportado el uso de un gran intervalo de concentraciones de ATP para la detección de MAP cinasas, que va desde nanomolar (Zhang y Liu, 2001) hasta micromolar (Gotoh *et al.*, 1990; Suzuki y Shinshi, 1995; Usami *et al.*, 1995). Por ello, se analizaron diferentes concentraciones de ATP frío a una concentración fija de [ $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATP] para elegir a aquella concentración de ATP en la que se observara un adecuado marcaje de la MBP sustrato. Los resultados muestran una curva bifásica, primero de incremento y después de

decremento y no una curva decreciente (posiblemente hiperbólica) como se esperaría, pues bajo el razonamiento de que altas concentraciones de ATP frío diluyen la cantidad de  $[\gamma^{32}\text{P-ATP}]$  fijo, la señal generada por las cinasas de MBP tendría que disminuir al incrementar la concentración de ATP frío. La fase creciente de la curva puede ser explicada por diferentes mecanismos: Uno de ellos implica que se estén activando fosfatasa. Al incrementarse la concentración de ATP frío, la señal de la MBP marcada con el isótopo radioactivo disminuye; por lo tanto se observa una menor desincorporación del  $[\gamma^{32}\text{P-ATP}]$  de la MBP cuando el isótopo radioactivo se encuentra más diluido. Otra hipótesis alterna plantea que en la fracción se encuentren ATPasas contaminantes que se encuentren hidrolizando. De igual forma, al incrementarse la concentración del ATP frío, éste es el más disponible para la hidrólisis que el marcado radioactivamente.

La concentración de ATP sin marcaje radioactivo que produjo una mayor fosforilación de la MBP fue de 25  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, la señal tan alta producida por esta concentración podría obstaculizar el análisis de la fosforilación de la MBP por efecto de los compuestos en estudio, ya que era muy probable sobreexponer la autorradiografía y por lo tanto sobreestimar los resultados; asimismo, en una película autorradiográfica sobreexpuesta es prácticamente imposible observar diferencias notorias en el nivel de fosforilación de la MBP. Por ello se eligió la concentración de 50  $\mu\text{M}$  de ATP.

## **8.2. Actividad de cinasa presente en FCs de embriones de maíz en germinación.**

La MBP es una proteína básica ( $pI= 11.6$ ) que representa aproximadamente el 30% del contenido proteico total de la mielina en el sistema nervioso central (Eng *et al.*, 1968); contiene cinco sitios de fosforilación: Ser<sup>7</sup>, Ser<sup>56</sup>, Thr<sup>97</sup>, Ser<sup>113</sup> y Ser<sup>163</sup> y se ha demostrado que diferentes cinasas la fosforilan *in vitro*. Es por ello que la MBP se emplea con frecuencia como un sustrato proteico para estudiar la actividad de varias cinasas de proteína (Chevalier y Allen, 2000), particularmente de las MAP cinasas ( $K_m$  aparente de 50  $\mu\text{M}$ ) (Erickson *et al.*, 1990). La MBP es fosforilada de manera específica por las MAP cinasas en el residuo de Thr<sup>97</sup> que se localiza en la secuencia -Thr-Pro-Arg-Thr<sup>97</sup>-Pro-Pro-Pro; el sitio aceptor del grupo fosfato es poco común, ya que contiene una secuencia conservada de prolinas (Pro-Pro-Pro) y posiblemente la fosforilación de la MBP en este residuo estabiliza al giro que conecta a dos segmentos con estructura secundaria de hojas  $\beta$ -plegadas de la proteína (Erickson *et al.*, 1990). A diferencia de las MAP cinasas, la PKC, que también emplea a la

MBP como sustrato *in vitro*, no fosforila a la MBP en este sitio. Las MAP cinasas muestran una preferencia por la MBP como sustrato y son incapaces de fosforilar a la histona (Seger *et al.*, 1992; Hardin, 1998; Link *et al.*, 2002) y a la caseína (Link *et al.*, 2002). Sin embargo, otras cinasas que no son activadas por mitógenos pueden usar MBP como sustrato de fosforilación (Kishimoto *et al.*, 1985; Turner *et al.*, 1985; Shoji *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1991; Shimomura *et al.*, 1993; Garriga *et al.*, 1996).

Para evaluar la actividad de cinasas presente en las FCs, se realizó un experimento en el que se emplearon diversos sustratos de cinasas: caseína, histona y MBP. Como se muestra en la Fig. 10, las FCs contienen una elevada actividad cinasa, pues los tres sustratos fueron fosforilados. Sin embargo, el nivel de fosforilación de la MBP y la histona fue similar entre éstas y considerablemente mayor al de la caseína. Este resultado sugiere que la MBP puede ser sustrato de varias cinasas presentes en las FCs de embriones de maíz (incluyendo a las MAP cinasas). Para diferenciar la actividad de MAP cinasas de otra(s) proteína(s) cinasa(s) que fosforile(n) a la MBP, es necesario realizar el ensayo en gel para determinar actividad de cinasas, pues sólo bajo estas condiciones, las MAP cinasas tienen la capacidad de renaturalizarse después de haber sido separadas por electroforesis desnaturalizante y por tanto de recuperar su actividad en el mismo gel (Gotoh, *et al.*, 1990).

### **8.3. Efecto en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos *in vitro* a la FB<sub>1</sub> o a los compuestos esfingoideos.**

En plantas se han identificado diversas MAP cinasas activadas tanto por evocadores fúngicos y bacterianos como por infecciones con patógenos. Estas demostraciones indican que las cascadas de MAP cinasas participan en la señalización de vías de defensa y que pueden constituir el principal mecanismo para activar las respuestas de defensa (Cardinale *et al.*, 2000).

Para evaluar si la FB<sub>1</sub> activaba cinasas de MBP en respuesta al ataque por patógenos en maíz, se emplearon FB<sub>1</sub> y embriones de maíz como modelo de estudio. La FB<sub>1</sub> es la principal toxina producida por un patógeno natural del maíz, *Fusarium verticillioides*, cuya estructura es análoga a las de las bases esfingoideas, interrumpiendo la biosíntesis de los esfingolípidos celulares al inhibir a la esfingánina N-aciltransferasa y, consecuentemente, alterando los niveles endógenos tanto de las bases esfingoideas como de los esfingolípidos complejos del hospedero (Yoo *et al.*, 1992; Riley *et al.*, 1994; Schroeder *et al.*, 1994). Es por



ello que también se estudió el efecto de la SN, PS y CE en la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz.

Existen dos reportes que demuestran que la  $FB_1$  induce la actividad de MAPKs de células de mamíferos de forma independiente a la acumulación de las principales bases esfingoideas en este sistema, la esfinganina y la esfingosina (Wattenberg *et al.*, 1996; Pinelli *et al.*, 1999). Este antecedente favorece la expectativa de encontrar MAP cinasas que sean afectadas por la  $FB_1$  en células vegetales.

En el curso de tiempo de la actividad de fosforilación basal, se encontró que hubo una señal de MBP- $^{32}P$  en el tiempo más corto explorado de 2 min y que ésta fue disminuyendo gradualmente hasta los 30 min. Comparativamente a esta cinética, se analizó el efecto de la  $FB_1$ , SN, PS y CE en la actividad de cinasas de MBP de las FCs de embriones de maíz expuestas *in vitro* a estos compuestos.

Los resultados de los experimentos que evaluaron el efecto del tiempo de exposición de las FCs a los compuestos de estudio, indican que la  $FB_1$  inhibió cinasas de MBP en forma decreciente con respecto al tiempo y un efecto semejante a éste lo mostró la SN; si bien ésta exhibió un mayor efecto de inhibición a tiempos cortos. Los otros compuestos esfingoideos (PS y CE) promovieron la defosforilación de la MBP en todo el intervalo de tiempo estudiado. Es probable que si se alargara el periodo de tiempo analizado, se detectaría un aumento en la actividad de cinasas de MBP tratadas con  $FB_1$  y SN, ya que durante el transcurso de la incubación, la actividad de estas cinasas se fue recuperando hasta alcanzar los niveles de fosforilación de la MBP de la condición control. Estos resultados indican por una parte, que los cuatro compuestos esfingoideos promueven una defosforilación de la MBP, pero también sugieren que en los casos de  $FB_1$  y SN, en los que la defosforilación disminuye a tiempos largos, podría estarse dando la activación de las cinasas de MBP. En relación con esto, es muy posible que estén presentes varios tipos de cinasas y fosfatasas, cada una de las cuales podría tener diferentes sensibilidades y cinéticas de respuesta a los compuestos esfingoideos y que se están expresando paralelamente.

Una forma de explorar la posibilidad de que los compuestos esfingoideos endógenos sean capaces de afectar la actividad de cinasas de MBP y al mismo tiempo de evaluar la sensibilidad de las cinasas de MBP a la  $FB_1$  y a los compuestos esfingoideos es la elaboración de curvas dosis-respuesta. En el laboratorio generalmente se han empleado

concentraciones de 1 a 50  $\mu\text{M}$  de la toxina  $\text{FB}_1$ , para evaluar su efecto en diferentes componentes celulares de los embriones de maíz. Estas concentraciones empleadas resultan ser apropiadas debido a que se estima que son aproximadas a las que pueden encontrarse en condiciones de contaminación natural del maíz con *Fusarium verticillioides*. Sin embargo, considerando que uno de los efectos de la  $\text{FB}_1$  es la inhibición de la esfinganina N-aciltransferasa y por ello la  $\text{FB}_1$  también puede elevar las concentraciones endógenas de bases esfingoideas y disminuir las de ceramida (Merrill *et al.*, 1997), era importante establecer el efecto de diferentes concentraciones de estos compuestos, que están en bajas concentraciones en condiciones celulares normales (Merrill *et al.*, 1997) y parecen aumentar transitoriamente bajo ciertos estímulos para funcionar como segundos mensajeros (Merrill *et al.*, 1997; Merrill *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2002).

Los experimentos dosis-respuesta indicaron que cada compuesto mostró comportamientos diferentes dependiendo de la concentración. El efecto defosforilante de la MBP observado a 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$ , SN o PS disminuyó a concentraciones menores a ésta y, en los casos de la  $\text{FB}_1$  y SN, se dieron inclusive efectos ligeramente estimuladores de la fosforilación de la MBP a una concentración de 100 nM. Una vez más, las cinéticas de la activación de cinasas de MBP inducidas por la toxina y por la SN fueron muy similares, ya que la máxima actividad de cinasas de MBP se presentó a la misma concentración de ambos compuestos. Estas coincidencias sugieren que la activación de cinasas de MBP inducida por la  $\text{FB}_1$  probablemente estén participando cinasas de MBP activadas por SN formada *de novo*, ya que es posible que en las FCs obtenidas por centrifugación a 17 000 g, se encuentren remanentes de sustratos endógenos de la esfinganina N-aciltransferasa, así como vesículas de retículo endoplásmico que contienen a esta enzima y a otras más que participan en la biosíntesis de esfingolípidos, llevando a una pequeña acumulación de SN y PS (Rivas, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2001). Si esto sucede, también es de suponer que la PS esté afectando la actividad de cinasas de MBP inducida por la  $\text{FB}_1$ , aunque con efecto contrario, ya que se encontró que la PS inactiva en general a las cinasas de MBP en los experimentos *in vitro*. En el caso de la CE no hubo un efecto de la concentración en la fosforilación de la MBP. Estos resultados indican que altas concentraciones de los compuestos (i.e. 10  $\mu\text{M}$ ) favorecen la defosforilación de la MBP y bajas concentraciones de algunos de ellos pueden estar estimulando alguna cinasa de MBP y no ser suficientes para inducir a algunas fosfatasa. Como estos experimentos se efectuaron con FCs, era de

esperarse que las cinasas de MBP expuestas *in vitro* a los compuestos de estudio, fueran más sensibles a la concentración de éstos en comparación con la exposición *in vivo*, pues existen menos barreras de permeabilidad que tiene que superar la FB<sub>1</sub> para interactuar con componentes intracelulares.

Sería interesante evaluar en el sistema de ensayo *in vitro*, tiempos mayores a 30 min de exposición a concentraciones de 100 nM de FB<sub>1</sub> o SN para ver si se obtienen niveles de fosforilación de MBP arriba de los de defosforilación.

#### **8.4. Efecto en la actividad de MAP cinasas de embriones de maíz expuestos *in vivo* a la FB<sub>1</sub> a los compuestos esfingoideos.**

Los experimentos *in vitro* representan una forma rápida y controlada para evaluar los efectos de la FB<sub>1</sub> y compuestos esfingoideos en la actividad de cinasas de MBP, a diferencia de los experimentos *in vivo*. Sin embargo, ambos enfoques no siempre son comparables entre sí y los resultados de estos experimentos lo demuestran. Son dos las principales diferencias involucradas en los experimentos *in vitro* e *in vivo*. En los experimentos *in vitro*, la accesibilidad de los compuestos esfingoideos y la toxina a las cinasas de MBP es rápida y efectiva, y está influenciada por componentes celulares adicionales que son liberados de compartimentos destruidos en el proceso de homogenización. En los experimentos *in vivo*, los compuestos esfingoideos y la FB<sub>1</sub> tienen una accesibilidad limitada a las cinasas de MBP o elementos relacionados, debido a las barreras naturales de permeabilidad que están presentes en los embriones y que aminoran su acceso a la fase citosólica lo cual disminuye las concentraciones efectivas intracelulares de los compuestos. Además, en los sistemas de adición de compuestos *in vivo* a los embriones, las estructuras celulares y la compartimentalización están intactas, por lo que puede haber una interacción más fisiológica entre los elementos que participan en la fosforilación/defosforilación de las cinasas de MBP, lo cual no ocurre en el mismo grado para el sistema de adición de los compuestos *in vitro*.

En los ensayos diseñados para comparar las diferencias entre las exposiciones *in vivo* e *in vitro* de los embriones de maíz con los compuestos de estudio en la actividad de cinasas de MBP, se pudo apreciar que al adicionarse a las FCs los compuestos de este estudio a una concentración de 10 µM, se inhibió la actividad de cinasas de MBP a valores significativos, del orden del 20 al 25%, cuando las FCs provenían de embriones de maíz

embebidos durante 6 horas y del 5 al 32% para embriones de maíz embebidos durante 24 horas.

Durante la exposición *in vivo* por 6 h a la FB<sub>1</sub>, no se logró ver una inhibición semejante a la observada por SN y PS (tanto *in vivo* como *in vitro*) (Fig. 12), aún cuando se esperaría que la FB<sub>1</sub> estuviera aumentando los niveles endógenos de SN y PS. Esto puede explicarse porque a estos tiempos la FB<sub>1</sub> produce sólo un pequeño aumento en los niveles de las bases esfingoideas intracelulares (Rivas, 2001), por lo que quizás estos niveles de los compuestos fueran suficientes para producir el efecto de defosforilación. El hecho de que con FB<sub>1</sub> persista una fosforilación de MBP al mismo nivel del control, sugiere que la FB<sub>1</sub> *per se* no está activando a una fosfatasa. Sin embargo, estas interpretaciones deben hacerse con cautela, pues por el ensayo con FCs, es posible tener expresadas las actividades de cinasas y fosfatasas simultáneamente y, lo que se mide, es el resultado neto de esas actividades.

Por otra parte, a las 24 h de administración de FB<sub>1</sub> a los ejes embrionarios de maíz, se han observado aumentos de 6.1 y 3.6 veces de SN y PS, respectivamente en homogenados totales (Rivas, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2001), por lo cual se esperaría que la FB<sub>1</sub> involucrara la acción combinada de esas dos bases esfingoideas. La sumatoria de los efectos independientes de SN y PS parecen apoyar esta probabilidad, al compararse con el hecho de que la FB<sub>1</sub> modifique ligeramente la fosforilación de la MBP con respecto al control (Fig. 13).

La SN añadida a los embriones a las 6 y 24 h, tuvo efectos diferentes. En el primer caso, produjo una defosforilación del 20% y en el segundo caso una fosforilación del 10% superior al control. Esto indica que puede haber varios factores que rigen el efecto de la SN y que pueden estar relacionados con diferencias en el metabolismo de la base a estos tiempos de imbibición (como su utilización por la esfingánina N-aciltransferasa o por una esfingosina cinasa), originando niveles diferentes de la especie activa, lo cual puede afectar la actividad de cinasas o fosfatasas de manera diferencial. Es importante hacer notar que los embriones son un sistema latente que va reactivando sus vías metabólicas a diferentes velocidades durante el periodo de imbibición (Bruni y Leopold, 1991). Es posible por tanto que el metabolismo de los compuestos esfingoideos añadidos a las 6 y 24 h, sea diferente. Sin embargo, era importante cerciorarse de que no hubiera una activación de cinasas de MBP a tiempos más cortos de 24 h. Por ello, una alternativa para probar tiempos cortos de

"encendido" o "apagado" de cinasas de MBP son los experimentos *in vitro*, realizando el ensayo en gel.

Con respecto a la PS y la CE, ambas tuvieron efectos muy pobres de fosforilar a la MBP (0-10%) tanto a las 6 h como a las 24 h. Evidentemente, y con base a los argumentos expuestos anteriormente para la SN, la PS y la CE presentan las mismas consideraciones sobre el metabolismo que la SN e inclusive la FB<sub>1</sub>.

Esencialmente de los experimentos con las exposiciones *in vivo* a las 24 h, se puede sugerir a la SN como un componente activador de las cinasas de MBP y a la PS como un compuesto inhibidor. Ambas condiciones son mucho más evidentes en el ensayo *in vitro*, lo cual cuantitativamente puede deberse a un efecto de concentración como se mencionó al principio de esta sección.

### **8.5. La actividad de cinasas de MBP es regulada por fosfatasas**

Al demostrar que la adición *in vitro* de la FB<sub>1</sub> y compuestos esfingoideos inhibieron cinasas de MBP, se evaluó la posible regulación de la actividad de estas proteínas por fosfatasas. Una alternativa para demostrar dicha regulación fue el uso de inhibidores de fosfatasas, cuya especificidad ha sido reportada anteriormente. Aparentemente el NaF es el mejor inhibidor de fosfatasas de amplio espectro (Ser/Thr y Tyr). En menor grado lo es el ácido okadaico (Gupta *et al.*, 1998). El Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> no distingue entre las proteínas fosfatasas Ser/Thr y las de amplio espectro y ha sido ampliamente utilizado para el estudio de fosfatasas citosólicas y membranales (Baizabal-Aguirre y González 1994; Arango *et al.*, 2003); por ello se estudió su efecto en dos diferentes concentraciones: 200 μM, para evaluar las fosfatasas citosólicas y 1 mM para evaluar fosfatasas e inclusive ATPasas membranales.

En los casos de las FCs expuestas *in vitro* a PS y CE, los resultados indican que la menor fosforilación de la MBP se produjo por la acción de fosfatasas y se observó que la adición de la mezcla de inhibidores con mayor concentración de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> produjo un mayor nivel de recuperación de la fosforilación de la MBP. Existen varias explicaciones para este efecto: una, que el Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> pudiera estar inhibiendo varias ATPasas y fosfatasas con una alta Km para ATP, (la concentración de ATP en el ensayo es de 50 μM) preservando así el sustrato de las cinasas fosforiladoras de la MBP. La ATPasa de la membrana plasmática es una de las proteínas membranales más abundantes y es inhibida por 200 μM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, pero su Km para ATP es de 200 mM (Baizabal-Aguirre y González 1994; Arango *et al.*, 2003)

lo cual hace poco probable que ésta fuera una enzima que estuviera consumiendo el ATP añadido en el ensayo. Otra explicación postula que sean las fosfatasa de Ser/Thr, las principales enzimas que estén inactivando a las cinasas que se fosforilan en estos residuos (incluyendo a las MAPKs). En el caso de la adición de la mezcla de inhibidores de fosfatasa a los FCs expuestas *in vitro* a la FB<sub>1</sub> y SN, éstas también aumentaron la fosforilación de la MBP y no hubo diferencia entre las mezclas de inhibidores, lo que sugiere que tanto las fosfatasa Ser/Thr como las de amplio espectro están inactivando las cinasas de MBP y es posible que el ácido okadaico y el NaF, que son inhibidores que inactivan preferencialmente a fosfatasa de amplio espectro, estén defosforilando el residuo de Tyr que aparentemente sólo lo contienen las MAPKs.

Por otro lado, se evaluó el efecto del ácido okadaico independientemente del efecto de la mezcla de inhibidores con alta concentración de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> en la fosforilación de la MBP por las FCs expuestas *in vitro* con PS y CE para compararlas entre sí. La adición del ácido okadaico a las FCs tratadas con los compuestos esfingoideos produjo un aumento considerable en el nivel de fosforilación de la MBP con respecto a la mezcla de inhibidores. Esto sugiere que la actividad de fosforilación de MBP estaba llevándose a cabo por fosfatasa de especificidad dual (propias de las MAPKs) del cual el ácido okadaico es un inhibidor potente, si bien también inhibe fosfatasa de Ser/Thr. Sin embargo, inexplicablemente la condición en la que se añadieron el ácido okadaico más el NaF y el Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, mostró un efecto menor que el del ácido okadaico sólo.

Las diferencias observadas en los dos sistemas de exposición (*in vivo* e *in vitro*) explican la complejidad del metabolismo de los esfingolípidos y de los efectos de los intermediarios, ya que en el sistema de exposición *in vivo*, los embriones de maíz contienen intactos los componentes que la conforman. La biosíntesis de esfingolípidos es una ruta muy compleja pues está altamente interconectada entre sí y está confinada al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi. Estas interconexiones unen dos o más módulos de señalización diferentes y las enzimas aparentemente son reguladas coordinadamente para responder a un estímulo externo (Hannun *et al.*, 2001). En la exposición *in vitro* de los embriones de maíz a los compuestos esfingoideos y a la FB<sub>1</sub>, los efectos en la fosforilación de la MBP están inducidos de manera directa por el compuesto añadido sin que medie su

metabolismo. Bajo este contexto, los compuestos tienen *per se* los siguientes efectos en la fosforilación de la MBP:

- ◆ La FB<sub>1</sub> y la SN activaron tanto a cinasas de MBP como a fosfatasas. Estos resultados sugieren que la SN es el principal efector de la fosforilación de la MBP en la actividad de las cinasas de MBP y fosfatasas. No obstante, aparentemente la FB<sub>1</sub> activó *per se* a una(s) cinasa(s) adicional(es) a la SN, pues el nivel de fosforilación de la MBP fue ligeramente mayor en presencia de la micotoxina. La modulación de la actividad de las cinasas de MBP (incluidas las MAP cinasas) depende de la actividad de proteínas fosfatasas y de calmodulina y esta función reguladora ha sido frecuentemente reportada en la literatura (Suzuki y Shinshi, 1995; Adam *et al.*, 1997; Bögre *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1999).

La adición de PS y CE a las FCs produjo una inhibición de cinasas de MBP mediadas por fosfatasas Ser/Thr probablemente. La actividad de estas últimas proteínas fue elevada, ya que el nivel de fosforilación de la MBP se decrementó en una magnitud considerable con respecto a la condición control. Las diferencias entre la fosforilación/defosforilación de MBP observada *in vivo* e *in vitro* pueden originarse de un desbalance producido por la expresión preferencial de cinasas o fosfatasas según sea el caso. No puede descartarse que en condiciones *in vitro* haya una expresión de fosfatasas que en condiciones *in vivo* están conferidas a los compartimentos celulares.

El análisis conjunto de los resultados descritos y de los reportes de la literatura sugieren que la FB<sub>1</sub> y los compuestos esfingoideos afectan la actividad de cinasas de MBP de embriones de maíz expuestos *in vivo* a través de los siguientes procesos:

- ◆ Debido a que la adición de la FB<sub>1</sub> a embriones de maíz produce una acumulación de esfinganina (Rivas, 2001; Gutiérrez, *et al.*, 2001), ésta domina los efectos intracelulares de la fumonisina. Tras el aumento de SN, es posible que ésta sea convertida principalmente a su forma fosforilada (esfinganina 1-fosfato) por la esfinganina cinasa, (Desai *et al.*, 2002), y en menor grado a PS y CE, pues los efectos de estos dos últimos compuestos en el nivel de fosforilación de la MBP fueron muy similares a las condiciones control. La elevación de esfinganina 1-fosfato parece ser un factor determinante de la toxicidad de la FB<sub>1</sub> en células animales, pues juega un papel importante en la inhibición de la apoptosis y es muy probable que exista una relación entre la toxicidad en las células que acumulan SN y la mitogénesis de las células que acumulan bases esfingoideas fosforiladas (Desai *et al.*, 2002). La esfinganina

1-fosfato es un intermediario altamente bioactivo que afecta tanto la actividad de cinasas de proteína como de fosfatasa (Merrill *et al.*, 2001) y este estudio demostró ambas actividades en los diferentes tiempos de exposición. Sin embargo, no se conocen los niveles de bases esfingoideas en el sistema modelo de embriones de maíz.

- ◆ Los resultados de la exposición de los embriones de maíz a CE revelaron una semejanza en el nivel de fosforilación de la MBP con respecto a la condición control. Esto sugiere que la CE no tenga efecto alguno en la actividad de cinasas de MBP ni de fosfatasa, o bien, que exista una activación simultánea de cinasas de MBP y fosfatasa con sensibilidades y cinéticas similares y por lo tanto el efecto neto sea percibido como el mismo nivel de fosforilación de la MBP que el de la condición control, ya que se han identificado diferentes mecanismos de acción de la CE en diversos tipos de células animales, entre los que se encuentran la activación de cinasas, cascadas de MAP cinasas (Raines *et al.*, 1993; Yao *et al.*, 1995) y fosfatasa (Hannun, 1994). Una alternativa para probar si la adición de CE provoca efectos reversibles a la depleción de la ruta biosintética de los esfingolípidos y por tanto de los provocados por la FB<sub>1</sub> en la actividad de cinasas de MBP, sería adicionar los dos compuestos (CE y FB<sub>1</sub>) juntos. Un efecto adicional de la CE añadida *in vivo*, es el de favorecer la formación de la glucosil ceramida u otros cerebrosidos. Estas, que son componentes de las membranas como la plasmática, pueden reforzar su estructura, protegiéndola contra el efecto disruptivo de la FB<sub>1</sub> en las células embrionarias (Gutiérrez, 1999c).

- ◆ El efecto de la adición de PS a los embriones de maíz fue similar al de la CE. Esto sugiere que la PS sea la principal base esfingoidea sustrato de la síntesis de la CE y consecuentemente el efecto en el nivel de fosforilación de la MBP sea análogo al de la CE.

- ◆ El efecto de la FB<sub>1</sub> en la fosforilación de la MBP, sería el resultado global de todos los escenarios descritos anteriormente, pues es muy probable que los esfingolípidos sean los que principalmente contribuyen a los efectos de esta micotoxina (Merrill *et al.*, 2001).

El análisis global de los resultados obtenidos en este trabajo indicó que los embriones de maíz respondieron a la FB<sub>1</sub> y a los compuestos esfingoideos mediante la activación de cinasas de MBP y fosfatasa.

Las FCs de embriones de maíz a los que no se les añadió los compuestos de estudio, revelaron la actividad basal de cinasas; esta característica nos permitió diferenciar la activación de fosfatasa promovida por los compuestos esfingoideos y la micotoxina. El



estudio de fosfatasa que inactivan MAP cinasas ha sido pobremente evaluada en plantas, entre las mejor caracterizadas se encuentran las fosfatasa que defosforilan Ser/Thr (Luan *et al.*, 1993; Stone y Walker, 1995; Smith y Walker, 1996) y sólo se ha caracterizado una sola fosfatasa de amplio espectro en *Arabidopsis thaliana* (Gupta *et al.*, 1998). Estos reportes proponen que sean las fosfatasa Ser/Thr las principales proteínas reguladoras de la actividad de las cinasas de proteína. Adicionalmente, al ser la MBP un sustrato inespecífico de diferentes cinasas Ser/Thr, es probable que la activación de las proteínas fosfatasa Ser/Thr sea la principal responsable del decremento considerable de la fosforilación del sustrato. En las cascadas de MAP cinasas, se ha propuesto que sean las MAPKKs las proteínas reguladoras de la actividad de las cascadas de MAPKs, ya que además de poseer una doble especificidad, éstas conectan diferentes cascadas de MAP cinasas para responder específicamente a un estímulo dado (Robinson y Cobb, 1997; Meskiene y Hirt, 2000). Estas consideraciones refuerzan la hipótesis de que sean la MAPKKs las que estén siendo reguladas por las fosfatasa Ser/Thr en nuestro sistema experimental.

## 9. CONCLUSIONES

---

---

◆ La fosforilación de la MBP podría estar efectuada por varios tipos de cinasas de proteína presentes en los embriones de maíz. En base a los resultados del sistema experimental, se sugiere que las MAP cinasas son las principales responsables de la fosforilación *in vitro* de la MBP.

◆ A pesar de haber detectado un efecto de inhibición de la fosforilación de la MBP durante la exposición *in vitro* de las fracciones citosólicas de embriones de maíz a la FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoideos, el efecto *in vivo* resultó en una discreta activación de cinasas de MBP. Esto implica que el mecanismo de acción de los compuestos esfingoideos durante la exposición *in vivo* no son sencillos.

◆ El efecto de los compuestos esfingoideos en la disminución de la fosforilación de MBP puede atribuirse a: a) un efecto directo de los compuestos sobre las MAP cinasas o b) un efecto de los compuestos sobre fosfatasas de MAP cinasas.

◆ En el caso de los experimentos *in vitro*, las fosfatasas de proteína pueden ser las responsables del decremento en el nivel de fosforilación de la MBP. Posiblemente, las fosfatasas de proteína Ser/Thr y/o de amplio espectro son las que medien este efecto, ya que en la literatura hay fuertes evidencias de que son este tipo de fosfatasas las que actúan sobre la MBP fosforilada por MAP cinasas. De ser cierta ésta última suposición, el mecanismo de regulación de las MAP cinasas concidiría con los mecanismos ampliamente reportados en mamíferos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abeles F., Morgan P. y Saltveit M. (1992) Ethylene in Plant Biology. Academic Press, San Diego, C. A.
- Adam. A. L., Pike, S. Hoyos, M. E., Stone, J. M., Walker, J. C. y Novacky, A. (1997) Rapid and transient activation of myelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from *Erwinia amylovora*. Plant Physiol, 115: 853-861.
- Agrios G. N. (1997) Plant Pathology. Academic Press. San Diego, California, USA. 4<sup>th</sup> ed. p. p. 73.
- A-H-Mackerness S., John C. F., Jordan B. y Thomas B. (2001) Early signalling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. FEBS Lett, 489: 237-242.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J. D. (1994) Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. New York & London. 3<sup>a</sup> ed. p. p. 202-205.
- Alcántara S. F. (1998) Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la integridad del ADN genómico de ejes embrionarios de maíz (*Zea mays* L.) durante la germinación. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Alessi D. R., Sarto Y., Campbell D. G., Cohen P., Sithanandam G. Rapp U, Ashworth A., Marshall C. J. y Cowley S. (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. EMBO J, 13: 1610-1619.
- Allan A. C. y Fluhr R. (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. Plant Cell, 9: 1559-1572.
- Anaya A.L. (2003) Ecología Química. Plaza y Valdes Editores. México. 1<sup>a</sup> ed. p. p. 119, 125.
- Anstätt C. y Tenhaken R. (2003) A mitogen-activated-protein kinase from soybean is activated by a pathogen and novel functional analogs of salicylic acid. Plant Physiol Biochem, 41: 929-934.
- Arango M., Gévaudant F., Outatole M. y Boutry M. (2003) The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. Planta, 216: 355-365.
- Baizabal-Aguirre V. M. y González de la Vara L. E. (1994) Characterization of the protein kinase activity in beet root plasma membranes. Physiol Plant, 91: 147-154.
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Sandalio L. M., Valderrama R., Palma J. M., Lupianez J. A. y del Rio L. A. (1999) Localization of nitric oxid synthase in plant peroxisomes. J Biol Chem, 274: 36729-36733.
- Bennett, J.W. (1983) Differentiation and secondary metabolism in mycelial fungi. In Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi. Bennet J. W. y A. Cieger, eds. Marcel. Dekker, Inc. New York. p. p. 1-32.
- Berberich T., Sano H. y Kusano T. (1999) Involvement of a MAP kinase, ZmMPK5, in senescence and recovery from low-temperature stress in maize. Mol Gen Genet, 262: 534-542.
- Bestwick C., S., Brown I. R., Bennet M. H. R. y Mansfield J. W. (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of Lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Plant Cell, 9: 209-221.
- Bischoff F., Molendijk A., Rajendrakumar C: S. V. y Palme K. (1999) GTP-binding proteins in plants. CMLS, Cell Mol Life Sci, 55: 233-256.
- Bögre, L., Ligterink, W., Heberle-Bors, E. y Hirt H. (1996) Mechanosensors in plants. Nature, 383: 489-490.
- Bögre, L., Ligterink, W., Meskiene, I., Baker, P., Heberle-Bors, E. y Hirt H. (1997) Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. Plant Cell, 9: 75-83.
- Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Baker p., Huskisson N. S., Hirt H. y Heberle-Bors E. (1999) A MAP kinase is activated late in mitosis and becomes localised to the plane of cell division. Plant Cell, 11: 1-15.
- Bögre L., Meskiene I., Heberle-Bors E. y Hirt H. (2000) Stressing the role of MAP kinases in mitogenic stimulation. Plant Mol Biol, 43: 705-718.

- Bolwell G. P., Butt U. S., Davies D. R. y Zimmerlin A. (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad Res Comm*, 23: 517-532.
- Bonas, U. y Lahaye T. (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol*, 5: 44-50.
- Borkovich K. A. (1996) Signal transduction pathways and heterotrimeric G proteins. In: *The Mycota, III. A comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research: Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 211-233. Brambl R. and Marzluf G. A. (eds) Springer, Berlin
- Bowler C. y Fluhr R. (2000) The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci*, 5: 241-245.
- Bowles D. J. (1993) Local and systemic signals in the wound response. *Semin Cell Biol*, 4:103-111.
- Brady J. D. y Fry S. C. (1997) Formation of di-isotyrosine and loss of isotyrosine in the cells walls of tomato cell-suspension cultures treated with fungal evocadors of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol*, 115: 87-95.
- Bruni F. y Leopold C. (1991) Hydration, protons and onset of physiological activities in maize seeds. *Physiol Plant*, 81: 359-366.
- Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland. 1<sup>a</sup> ed. p. p.1103.
- Bushnell W. R. y Rowell J. B. (1981) Suppressor of defense reactions: a model for roles in specificity. *Phytopathology*, 71: 1012-1014.
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T. y Hirt H. (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct evocadors. *J Biol Chem*, 275: 36734-36740.
- Carmona S. L. (2003) Identificación de polipéptidos fosforilados diferencialmente en embriones de maíz expuestos a la fumonisa B<sub>1</sub>. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química, UNAM.
- Cazalé, A-C-D, M-J-Wilson, C-H-Bors, E-B-Brygoo y Christiane H-L.(1999) MAP kinase activation by hypoosmotic stress of tobacco cell suspensions: towards the oxidative burst response? *Plant J*, 19: 297-307.
- Chant J. y Stowera I. (1995) GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis and more. *Cell*, 81: 1-4.
- Chevalier D. y Allen B. G. (2000) Purification of myelin basic protein from bovine brain. *Protein Expr Purif*, 18: 229-234.
- Clarke A., Desikan R., Hurst R. D., Hancock J. T. y Neill S. J. (2000) NO way back: nitric oxid and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J*, 24: 667-677.
- Corpas F. J., Barroso J. B. y del Rio L. A. (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci*, 6: 145-150.
- Croft, K. P. C., Jünter F. y Slusarenko A. J. (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol*, 101: 13-24.
- Dangl J. y Houlb E. (1997) La dulce vita: a molecular feast in plant-pathogen interactions. *Cell*, 91:17-24.
- Davies P. J. (1995) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers. London. 2<sup>nd</sup> ed.
- De la Torre M. E., Rivas S. M., Rocío Cruz-Ortega, Gavilanes-Ruiz M. y Plasencia J. Introduction of nuclease expression and activity by disruption of sphingolipid metabolism in germinating maize seeds. 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology. Barcelona, España. Junio 23-28, 2003.
- Deacon, J.W. (1997) *Modern Mycology*. Blackwell Science. Gran Bretaña.
- Decrooq-Ferrant V., Decrooq S., VanWent J., Schmiat E. y Kreis M. (1995) A homolog of the MAP/ERK family of protein kinase genes is expressed in vegetative and in female reproductive organs of *Petunia hybrida*. *Plant Mol Biol*, 27: 339-350.
- Denhardt D. T. (1996) Signal transduction protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signaling. *Biochem J*, 318: 729-747.

- Desai K., Sullards M. C., Allegood J., Wang E., Schmelz E. M., Hartl M., Humpf H-U., Liotta D. C., Peng Q. y Merrill A. H. Jr. (2002) Fumonisin and fumonisins analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1585: 188-192.
- Desikan R., Hancock J. T., Coffey M. J. y Neill S. J. (1996) Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett*, 382: 213-217.
- Desikan R., Reynolds A., Hancock J. T. y Neill S. J. (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J*, 330: 115-120.
- Desikan R., Neill S. J. y Hancock J. T. (2000) Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radic Biol Med*, 28: 773-778.
- Dixon M. y Webb E. C. (1979) *Enzymes*. Longman, New York, 3ª edic., p.p. 248, 505.
- Dröillard M. J., Thibivilliers S., Cazalé A. C., Barbier-Brygoo H. y Lauriere C. (2000) Protein kinases induced by osmotic stresses and evocador molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Lett*, 474: 217-222.
- Duerr B., Gawienowski M., Roop T. y Jacobs T. (1993) MsERK1: a mitogen activated protein kinase from a flowering plant. *Plant Cell*, 5: 87-96.
- Durner J., Shah J. y Klessig D. F. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci*, 2: 266-274.
- Durner J. y Klessig D. F. (1999) Nitric oxid as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2: 369-374.
- Eng L. F., Gersil F.-C., Pratt D. y Tavaststjerna M. G. (1968) The maturation of human white matter myelin. Fractionation of the myelin membrane proteins. *Biochemistry*, 7:4455-4465.
- Enríquez, M. C., Gutiérrez N., Plasencia J. y Gavilanes-Ruiz M. Cambios cinéticos en la actividad de la Glucán Sintetasa inducidos por la fumonisina B1 en embriones de maíz durante la germinación. XII Congreso de Bioenergética y Biomembranas, Querétaro, Qro. México. Noviembre 18-22, 2001.
- Erickson A K., Payne D. M., Martino P. A., Rossomando A. I., Shabanowitz J., Weber M. J., Hunt D. F. y Sturgill T. W. (1990) Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 265: 19728-19735.
- Fanger G. R., Gerwins P., Widmann C., Jarpe M. B. y Johnson G. L. (1997) MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev*, 7: 67- 74.
- Fantini J., Hammache D., Delézy O., Yahi N., André-Barrès C., Rico-Lattes I. y Lattes A. (1997) Synthetic soluble analogs of galactosyl-ceramide (GalCer) bind to the V3 domain of HIV-1 gp 120 and inhibit HIV-1 induced fusion and entry. *J Biol Chem*, 272: 7245-7252.
- Farmer E. E. y Ryan C. A. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, 4: 129-134.
- Ferrel J. E. Jr (1996) Tripping the switch: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem Sci*, 21: 460-466.
- García-Ranea J. A. y Valencia A. (1998) Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 434: 219-225.
- Garibay F. J., Enríquez-Arredondo C., Plasencia J. y Gavilanes-Ruiz M. Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la actividad de la Glucán Sintetasa II de embriones de maíz. XXII Congreso Nacional de Bioquímica. Acapulco, Guerrero. México. Noviembre 19-24, 2000.
- Garriga J., Segura E., Mayol X., Grubmeyer C. y Grana X. (1996) Phosphorylation site specificity of the CDC2-related kinase PITALRE. *Biochem J*, 320: 983-981.
- Garrington T. P. y Johnson G. L. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 211-218.
- Gelderblom W. C. A., Cawood M. E., Snyman S. D. y Marasas W. F. O. (1994) Fumonisin B<sub>1</sub> dosimetry in relation to cancer initiation in rat liver. *Carcinogenesis*, 15: 209-214.

- Gelderblom W. C. A., Snyman S. D., van der Lugt J. J. y Marasas W. F. O. (1995) Mitoinhibitory effect of fumonisin B<sub>1</sub> on rat hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis*, 16: 625-631.
- Ghosh S., Gepstein S., Heikkilä J. J. y Dumbroff E. B. (1988) Use of a scanning densitometer or an ELISA plate reader for measurement of nanogram amounts of protein in crude extracts from biological tissues. *Anal Biochem*, 169: 227-233.
- Gloer, J. B. (1996). New antifungal and antiinsecticidal natural products from fungi: an ecology-based approach. *Rev Latinoamer Quim* 24 (3-4): 191-208.
- Gloer, J.B. (1997). Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. In: *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*. Wicklow D. y B. Sönderström, eds. Springer-Verlag. Alemania. p. p. 249-268.
- Goodman R. N. y Novacky A. J. (1994) *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens*. St. Paul: APS Press.
- Gotoh Y., Nishida E., Yamashita T., Hoshi M., Kawakami M. y Sakai H. (1990) Microtubules-associated protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. *Eur J Biochem*, 193: 661-669.
- Grill E. y Himmerbalch A. (1998) ABA signal transduction. *Curr Opin Plant Biol*, 1: 412-418.
- Guan K. L. (1994) The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell Signal*, 6: 581-589.
- Guan L. M., Zhao J. y Scandalios J. G. (2000) *Cis*-elements and *trans*-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant J*, 22: 87-95.
- Gupta R., Huang Y., Kieber J. y Luan S. (1998) Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from *Arabidopsis*. *Plant J*, 16: 581-589.
- Gupta R., Ting J. T., Sokolov L. N., Johnson S. A. y Luan S. (2002). A tumor suppressor homolog, AtPTEN1, is essential for pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14: 2495-2507.
- Gustin M. C., Albertiny J., Alexander M. y Davenport K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microl Mol Biol Rev*, 62: 1264-1300.
- Gutiérrez-Nájera, N., Plasencia J. y Gavilanes-Ruiz, M. Effects of fumonisin B<sub>1</sub> on the plasma membrane from germinating maize embryos. VI International Workshop on Seed Biology. Mérida, Yucatán. México. Enero 24-28, 1999a.
- Gutiérrez-Nájera, N., Plasencia J. y Gavilanes-Ruiz, M. Fumonisin B<sub>1</sub> modifies the fluidity of plasma membrane from germinating maize embryos. IX Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de plantas. Tercer Simposio México-Estados Unidos. Mérida-Yucatán. México. 30 de octubre-2 de noviembre, 1999b.
- Gutiérrez-Nájera, N. (1999c) Efecto de la fumonisin B<sub>1</sub> sobre la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de embriones de maíz. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Gutiérrez-Nájera, N., El Hafidi M., Plasencia J., Enríquez-Arredondo C. y Gavilanes-Ruiz, M. Effects of fumonisin B<sub>1</sub> on the plant plasma membrane: fumonisin B<sub>1</sub> modifies the lipid composition of the membrane. X Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Cuarto Simposio México-Estados Unidos. La Paz, Baja California Sur. México. Octubre 27-30, 2001.
- Hall M. A., Novikova G. V., Moshkov I. E., Mur L. A. J. y Smith A. R. (2002) Protein kinases in plants in the transduction of abiotic and biotic signals. *Russ J Plant Physiol*, 49: 107-119.
- Halliwell B. y Gutteridge J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186: 1-85.
- Hammond-Kosack K. E. y Jones J. D. G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8: 1773-1791.
- Hammond-Kosack K. E. y Parker J. E. (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotech*, 14:177-193.
- Hannun Y. A. (1994) The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem*, 269: 3125-3128.
- Hannun Y. A. y Obeid L. M. (1995) Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci*, 20: 73-77.

- Hannun Y. A., Luberto C. y Argraves K. M. (2001) Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to interactive signaling. *Biochemistry*, 40: 4893-4903.
- Hardin S. C. y Wolniak S. M. (1998) Molecular cloning and characterization of maize ZmMEK1, a protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen- and stress- activated protein kinase kinases. *Planta*, 206: 577-584.
- Haschek W. M., Gumprecht L. A., Smith G., Tumbleson M. E. y Constable P. D. (2001) Fumonisin toxicosis in Swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ Health Perspect*, 109 (Suppl 2): 251-257.
- Heath M. C. y Skalamera D. (1997) Cellular interactions between plants and biotrophic fungal parasites. In: *Advances in Botanical Research*. Andrews JH eds. Academic Press, San Diego p. p. 195-225.
- Holthuis J. C. M., Pomorski T., Riggers R. J., Sprong H. y Van Meer G. (2001) The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol Rev*, 81: 1689-1723.
- Hoyos M. E., Zhang S., Johal G. S., Klessig D. F., Hirt H., Pike S. M. y Novacky A. J. (1998) Is harpin-activated protein kinase related to salicylic acid- or fungal elicitor-induced kinases? *Plant Physiol*, Suppl: 46-47.
- Hoyos M. E. y Zhang S. (2000) Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. *Plant Physiol*, 122: 1355-1363.
- Humpf H. U., Schmelz E. M., Meredith F. I., Vesper H., Vales T. R., Menaldino D. S., Liotta D. C. y Merrill A. H. Jr. (1998) Acylation of naturally occurring and synthetic 1-deoxysphinganine by ceramide synthase: formation of *N-palmitoyl-aminopentol* PAP<sub>1</sub> produces a toxic metabolite of hydrolyzed fumonisin AP1, and a new category of ceramide synthase inhibitor. *J Biol Chem*, 273: 19060-19064.
- Huttly A. K. y Phillips A. L. (1995) Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cells of two kinases that show homology to MAP kinase and ribosomal protein kinase. *Plant Mol Biol*, 27: 1043-1052.
- Ichimura K., Mizoguchi T. y Shinozaki K. (1997) AtMRK1, an *Arabidopsis* protein kinase related to mammalian mixed-lineage kinases and Raf protein kinases. *Plant Sci*, 130: 171-179.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B E., Morris P. C., Innes R. W., Ecker J. R., Scheel D., Klessig D. F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y. y Walker J. C. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trend Plant Sci*, 7: 301-308.
- Iwabuchi K., Handa K. y Hakomori S. I. (1998) Separations of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signalling. *J Biol Chem*, 273: 33766-33773.
- Johnson L. N., Noble M. y Owen D.J. (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85: 149-158.
- Jonak C., Páy A., Bögre L., Hirt H. y Heberle-Bors E. (1993) The plant homologue of MAP kinase is expressed in a cell cycle-dependent and organ-specific manner. *Plant J*, 3:611-617.
- Jonak C., Kiegerls S., Lloyd C., Chan J. y Hirt H. (1995) MMK2 a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Mol Gen Genet*, 248: 686-694.
- Jonak C., Kiegerls, Ligterink W., Barker P. J., Hurkisson N. S. y Hirt H. (1996) Stress signalling in plants: a MAP kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 11274-11279.
- Jonak C., Ligterink W. y Hirt H. (1999) MAP kinases in plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci*, 55: 204-213.
- Jones D. A. y Jones J. D. G. (1996) The roles of leucine rich repeats in plant defences. *Adv Bot Res Adv Plant Pathol*, 24: 90-167.
- Jouanin S., Hamal A., Leprince A-S., Tregear J. W., Kreis M. y Henry Y. (1999) Characterisation of novel plant genes encoding MEKK/STE11 and RAF-related protein kinases. *Gene*, 229: 171-181.
- Karlsson K. A. (1970) On the chemistry and occurrence of sphingolipid long-chain bases. *Lipids* 5: 6-43.

- Karlsson K. A., (1986) Animal glycolipids as attachment sites for microbes. *Chem Phys Lipids*, 42: 153-172.
- Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B., Wingsle G., Creissen G. y Mullineaux P. (1999) Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*, 284: 654-657.
- Kauss, H. (1990) Role of the plasma membrane in host-pathogen interactions. In: *The Plant Plasma Membrane-Structure, Function and Molecular Biology*, C. Larsson and I. M. Moller, eds (Berlin: Springer-Verlag), p. p. 320-350.
- Keppler L. D. y Novacky A. (1986) Involvement of membrane lipid peroxidation in the development of bacterially induced hypersensitive reaction. *Phytopatology*, 76: 104-108.
- Keyse S. M. (1998) Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin Cell Dev Biol*, 9: 143-152.
- Kieber J. J., Rothenberg M., Roman G., Feldmann K. A. y Ecker J. R. (1993) *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, 72: 427-441.
- Kishimoto A., Nishiyama K., Nakanishi H., Uratsuji Y., Nomura H., Takeyama Y. y Nishizuka Y. (1985) Studies of the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biochem*, 260: 12492-12499.
- Knogge W. (1996) Fungal infection of plants. *Plant Cell*, 8: 1711-1722.
- Kobe B. y Deisenhofer J. (1995) Proteins: with leucine rich repeats. *Curr Opin Struct Biol*, 5: 409-416.
- Kolesnick R. N. y Krönke M. (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 643-665.
- Kombrink E. y Somssich I. E. (1995) Defense responses of plants to pathogens, in *Advances in Botanical Research* (Andrews, J. H. y Tommerup, I. C., eds) pp 1-34 Academic Press.
- Lamb, C. y Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 251-275.
- Langebartels C. S., Schraudner M. Heller W., Ernst D. y Sandermann H. (2000) Oxidative stress and defence reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. In: Inzé D, Van Montagu M., eds. *Oxidative stress in plants*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 105-135.
- Lee S., Choi H., Suh S., Doo I-S, Oh K-Y, Choi E. J., Taylor A. T. S., Low p. S. y Lee Y. (1999) Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelia communis*. *Plant Physiol*, 121: 147-152.
- Lehninger A. L., Nelson D. L. & Cox M. M. (1993) *Principios de Bioquímica*. Worth Publishers, New York, 2ª ed. p. p. 406.
- Leshem Y. Y., Wills R. B. H. y Veng-Va Ku V. (1998) Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem*, 36: 825-833.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R. y Lamb C. (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79: 583-593.
- Li J. X. y Assmann S. M. (1996). An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean. *Plant Cell*, 8: 2359-2368.
- Ligterink W., Kroj T., zur Nieden U., Hirt H. y Scheel D. (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*, 276: 2054-2057.
- Lowenstein C. J. y Snyder S. H. (1992) Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*, 70: 705-707.
- Luan S., Li W., Rusnak F., Assmann S. M. y Schreiber S. L. (1993) Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of potassium channels in guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 2202-2206.
- Luan S. (2002) Tyrosine phosphorylation in plant cell signalling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 11567-11569.
- Lynch D. V. (1993), Sphingolipids. In: *Lipid Metabolism in Plants*. Moore T.S. Jr., ed. Boca Raton, F. L. CRC Press, pp. 285-308.



- Mandala S. M., Thornton R. A., Frommer B. R., Curotto J. E., Rozdilsky W., Kurzt M. B., Giacobbe R. A., Bills G. F., Cabello M. A., Martin I. Pelaez F. y Harris G. H. (1995) The discovery of australifungin, a novel inhibitor of sphinganine N-acyltransferase activity from *Sporomniella australis* producing organisms, fermentation, isolation, and biological activity. *J Antibiot* (Japan), 48: 349-356.
- Marasas W. F. O. (2001) Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Env Health Persp*, 109 (Suppl 2): 239-243.
- McAinsh M. R., Clayton H., Mansfield T. A. y Hetherington A. M. (1996) Changes in stomatal behaviour and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol*, 111: 1031-1042.
- Merrill A. H. Jr (1983) Characterization of serine palmitoyltransferase activity in chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*, 754: 284-291.
- Merrill A. H. Jr, van Echten G., Wang E. y Sandhoff K. J. (1993) Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and *de novo* sphingolipid biosynthesis in cultured neurons *in situ*. *J Biol Chem*, 268: 27299-27306.
- Merrill A. H. Jr., Liotta D. C. y Riley R. T. (1996) Fumonisin: fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Trends Cell Biol*, 6: 218-223.
- Merrill A. H. Jr., Schmelz E. M., Dillehay D. L., Spiegel S., Shayman J. A., Schroeder J. J., Riley R. T., Voss K. A., y Wang E. (1997) Sphingolipids- the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol*, 142: 208-225.
- Merrill A. H. Jr., Sullards M. C., Wang E., Voss K. A. y Riley R. T. (2001) Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Env Health Persp*, 109 (Suppl 2): 283-289.
- Merrill A. H. Jr. (2002) *De novo* sphingolipid biosynthesis: a necessary but dangerous, pathway. *J Biol Chem*, 277: 25843-25846.
- Meskiene I. y Hirt H. (2000) MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol Biol*, 42: 791-806.
- Mikolajczyk M., Awotunde O. S., Muszynska G., Klessig D. F. y Dobrowolska G. (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell*, 12: 165-178.
- Mizoguchi T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Kaada H. y Shinozaki K. (1993) ATMPKs: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBBS Lett*, 336: 440-444.
- Mizoguchi T., Gotoh Y., Nishida E., Yamaguchi-Shinozaki K., Hayashida N., Iwasaki T., Kamada H. y Shinozaki K. (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J*, 5:111-122.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto K. y Shinozaki, K. (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 765-769.
- Mori I. C. y Muto S. (1997) Abscisic acid activates a 48-kilodalton protein kinase in guard cell protoplast. *Plant Physiol*, 102: 1227-1235.
- Morris P. C. (2001) MAP kinase signal transduction pathways in plants. *New Phytol*, 151: 67-89.
- Morris E. R. y Walker J. C. (2003) Receptor-like protein kinases: the keys to response. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 339-342.
- Munnik T., Ligterink W., Meskiene I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A. y Hirt H. (1999) Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J*, 20: 381-388.
- Murphy A. M., Chivasa S., Singh P. y Carr J. P. (1999) Salicylic acid-induced resistance to viruses and the other pathogens: a parting of the ways? *Trends Plant Sci* 4: 155-160.

- Nakamura S., Kosutzumi Y., Sun Y., Moyake Y., Fujita T. y Kawasaki T. (1996) Dual roles of sphingolipids in signalling of the scape from and onset of apoptosis in a mouse cytotoxic T-cell line, CTLL-2. *J Biol Chem*, 271: 1255-1257.
- Navarre D. A., Windehenne D., Durner J., Nood R. y Klessig D. F. (2000) Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol*, 122: 573-582.
- Neer E. J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80: 249-257.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D. y Hancock J. T. (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot*, 53: 1237-1247.
- Ohana, P., Benziman M. y Delmer, D. P. (1993). Stimulation of callose synthesis *in vivo* correlates with changes in intracellular distribution of the callose synthase activator  $\beta$ -furfuryl- $\beta$ -glucoside. *Plant Physiol*, 101: 187-191.
- Orozco-Cardenas M. y Ryan C. (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plants leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 6553-6557.
- Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux y Hirt H. (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signalling in plants. *EMBO J*, 22: 1282-1288.
- Pei Z-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G. J., Grill E. y Schroeder J. I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*, 406: 731-734.
- 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.
- Pinelli E., Poux N., Garren L., Pipy B., Castegnaro M., Miller D. J. y Pfohl-Leschowicz (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase by fumonisin B<sub>1</sub> stimulates cPLA<sub>2</sub> phosphorylation, the arachidonic acid cascade and cAMP production. *Carcinogenesis*, 20: 1683-1688.
- Pittet A., Parisod Y. y Schellenberg (1992) Occurrence of fumonisin B1 and B2 in corn-based products from the Swiss market. *J Agric Food Chem*, 40: 1352-1354.
- Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A. y Stewart C. R. (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6: 65-74.
- Riboni L., Viani P., Bassi R., Prinetti A. y Tettamanti G. (1997) The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res*, 36: 153-195.
- Riley R. T., Voss K. A., Yoo H., Gelderblom W. C. A. y Merrill A. H. (1994) Mechanism of fumonisin toxicity and carcinogenicity. *J Food Protect*, 57: 528-535.
- Riley R. T., Wang E., Schroeder J. J., Smith E. R., Plattner R. D., Abbas H., Yoo H.-S. y Merrill A. H. Jr. (1996) Evidence of disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. *Nat Toxins*, 4: 3-15.
- Riley R. T., Enongene E., Voss K. A., Norred W. P., Meredith F. I., Sharme R. P., Spitsbergen J., Williams D. E., Carlson D. B. y Merrill A. H. Jr (2001) Sphingolipid perturbation as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 109 (Suppl 2): 301-308.
- Rivas S. M. (2001) Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia en los niveles de bases esfingolípicas en ejes embrionarios de maíz expuestos a la fumonisin B1. Tesis de licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- Rivas S. M., Gavilanes-Ruiz M. y Plasencia J. Role of the sphingolipids in the accumulation of salicylic acid in germinating maize. XI Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de plantas. Quinto Simposium México-Estados Unidos. Acapulco, Guerrero. México. Noviembre 3-7, 2003.
- Robinson M. J. y Cobb M. H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 180-186.
- Romeis T., Piedras P., Zhang S., Klessig D. F. Hirt H. y Jones J. D. (1999) Rapid *Avr-9* and *Cf-9*-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, evocador, wound and salicylate responses. *Plant Cell*, 11: 273-287.
- Romeis T. (2001) Protein kinases in the plant defense response *Curr Opin Plant Biol*, 4: 407-414.

- Rossomando A. J., Dent P., Sturgill T. W. y Marshak D. R. (1994) Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 14: 1594-1602.
- Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willits M. G., Molina A., Steiner H-Y. y Hunt M. D. (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*, 8: 1809-1819.
- Samuel, M. A., Miles G, P. y Ellis B. E. (2000) Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant J*, 22: 367-376.
- Sánchez R. D. (2003) Aislamiento y detección de *Fusarium verticillioides* y de fumonisinas en maíz (*Zea mays*). Tesis de licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química. UNAM.
- Sander C. y Valencia A. (1995) The ras superfamily. In: Guidebook to the small GTPases, pp 12-20, Zerial M. and Huber L. A. (eds) Oxford University, Oxford.
- SanJuan B. A. (2001) Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta de hipersensibilidad en ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Sanz A., Moreno J. I. y Castresana C. (1998) PLOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase. *Plant Cell*, 10: 1523-1537.
- Schägger H. y Von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166: 368-379.
- Schoreder J. J., Crane H. M., Xia J., Liotta D. C. y Merrill A. H. Jr (1994) Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1. A molecular mechanism for carcinogenesis associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem*, 269: 3475-3481.
- Seger R., Ahn N. G., Posada J., Munar E. S., Jensen A. M., Cooper J. A., Cobb M. H. y Krebs E. G. (1992) Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem*, 267: 14373-14381.
- Seo S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H. y Ohashi, Y. (1995) Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science*, 270:1988-1992.
- Shah J. (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 365-371.
- Shimomura R., Sakai K., Tanaka Y., Yonezawa K., Hashimoto E., Kasuga M. y Yamamura H. (1993) Phosphorylation sites of myelin basic protein by a catalytic fragment of non-receptor type protein-tyrosine kinase p72 (sik) and comparison with those by insulin receptor kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 192: 252-260.
- Shiu S-H., Bleecker A. (2001) Receptor-like kinase from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family: related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 10763-10768.
- Shoji S., Ohnishi J., Funakoshi T., Fukunaga K., Miyamoto E., Ueki H. y Kuobta Y. (1987) Phosphorylation sites of bovine brain myelin basic protein phosphorylated with Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-depedent protein kinase from rat brain. *J Biochem*, 102: 1113-1120.
- Showalter A. M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5: 9-23.
- Silva N. y Goring D. (2002) The proline-rich, extensin-like receptor kinase-1 (PERK1) gene is rapidly induced by wounding. *Plant Mol Biol*, 50: 667-685.
- Slusarenko, A. J. (1996) The role of the lipoxigenase in resistance of plants to infection. In *Lipoxigenase and Lipoxigenase Pathway Enzymes*. G. J. Piazza ed. Champaign, IL: AOCS Press. p. p. 176-197.
- Smith R. D. y Walker J. C. (1996) Plant protein phosphatases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 101-125.
- Solfrizzo M., Visconti A., Avantaggiato G., Torres A. y Chulze S. (2000) *In vitro* and *in vivo* studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent of fumonisins. *Mycopathologia*, 151: 147-153.
- Somssich I. E. y Hahlbrock K. (1998) Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci*, 3: 86-89.
- Spiegel S. (1999) Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *J Leukocyte Bio*, 65: 341-344.

- Stafstrom J. P., Altschuler M. y Anderson D. H. (1993) Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea. *Plant Mol Biol*, 22: 83-90
- Staskawicz B. J., Mudgett M. B., Dangl J. L. y Galan J. E. (2001) Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* 292: 2285-2289.
- Stevens V. L., Nimkar S., Jamison W. C., Liotta D. C. y Merrill A. H. Jr (1990) Characteristics of the growth inhibition and cytotoxicity of long-chain (sphingoid) bases for Chinese hamster ovary cells: evidence for an involvement of protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1051: 37-45.
- Stone J. M. y Walker J. C. (1995) Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol*, 108: 451-457.
- Suzuki K., Yano y Shinshi H. (1995) Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with fungal evocador. *Plant Cell*, 7: 639-647.
- Suzuki K., Yano y Shinshi, H. (1999) Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. *Plant Physiol*, 119: 1465-1472.
- Suzuki K. (2002) MAP kinase cascades in evocador signal transduction. *J Plant Res*, 115:237-244.
- Tanoue T., Adachi M., Moriguchi T. y Nishida E. (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*, 2: 110-116.
- Tena G., Asai T., Chiu W. L. y Sheen J. (2001) Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr Opin Plant Biol*, 4: 392-400.
- Tolleson W. H., Melchior W. B., Morris S. M., McGarrity L. J., Domon O. E., Muskhelishvili L., James S. J., y Howard P. C. (1996) Apoptotic and antiproliferative effects of fumonisin B<sub>1</sub> in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. *Carcinogenesis*, 17:239-246.
- Turner R. S., Kempt B. E., Huai-de Su y Kio J. F. (1985) Substrate specificity of phospholipid/Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase as probed with synthetic peptide fragments of the bovine myeline protein. *J Biol Chem*, 260: 11503-11507.
- Usami, S., Banno, H., Ito Y., Nishimama, R., y Machida, Y. (1995) Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:8660-8664.
- Wagner T. y Kohorn B. (2001) Requirement for the induced expression throughout plant development and are required for the cell expansion. *Plant Cell*, 13: 303-318.
- Wang Q., Smith J. B., Harrison M. L. y Geahlen (1991) Identification of tyrosine 67 in bovine brain myelin basic protein as a specific phosphorylation site for thymus p56lck. *Biochem Biophys Res Commun*, 192: 252-260.
- Wattenberg E. V., Badria F. A. y Shier W. R. (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by the carcinogenic mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub>. *Biochem Biophys Res Commun*, 227: 622-627.
- Wei L., Hubbard S. R., Smith R. F. y Ellis L. (1994) Protein kinase superfamily-comparisons of sequence data with three-dimensional structures. *Curr Opin Struct Biol*, 4: 450-455.
- Widmann C., Goibson S., Jarpe M. B. y Johnson G. L. (1999) Mitogen-activated protein kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79: 143-180.
- Wild J., Kley D., Rockel P. y Segschneider H. J. (1997) Emission of NO from several higher plant species. *J Geophys Res*, 102: 5919-5927.
- Wilson C., Eller N., Gartner A., Vicente O. y Heberle-Bors E. (1993) Isolation and characterization of a tobacco cDNA clone encoding a putative MAP kinase. *Plant Mol Biol*, 23: 543-551.
- Wilson C., Anhlmayer R., Vicente O. y Heberle-Bors E. (1995) Molecular cloning functional expression in *Escherichia coli*, and characterization of multiple mitogen-activated protein kinases from tobacco. *Eur J Biochem*, 233: 249-257.
- Wilson C., Vroni V., Touraev A., Vicente O. y Heberle-Bors E. (1997) A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. *Plant Cell*, 9: 2093-2100.
- Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, 322: 681-692.
- Wojtaszek P. (2000) Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry*, 54: 1-4.
- Wrzaczek M. y Hirt H. (2001) Plant MAP kinase pathways: how many and what for? *Biol Cell*, 93: 81-87.

- Xu Q., Fu H-H., Gupta R. y Luan S (1998) Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphates encoded by a stress-responsive gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 849-857.
- Yamasaki H. y Sakihama Y. (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett*, 468: 89-92.
- Yang Y., Shah J. y Klessig D. F. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev*, 11: 1621-1639.
- Yoo H. S., Norred W. P., Wang E., Merrill A. H. Jr y Riley R. T. (1992) *Toxicol Appl Pharmacol*, 114: 9-15.
- Zhang Z., Collinge D. B. y Thordal-Christensen H. (1995) Germin-like oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J*, 8: 139-145.
- Zhang S., Du H. y Klessig D. F. (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate evocador and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell*, 10: 435-450.
- Zhang S. y Klessig D.F. (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 7225-7230.
- Zhang S. y Klessig D. F. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci*, 6: 520-527.
- Zhang S. y Liu Y. (2001) Activation of acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense.
- Zheng C. F. Y Guan K. L. (1994) Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J*, 13: 1123-1131.

### *Imbibición de los embriones de maíz con FB<sub>1</sub> o compuestos esfingoideos.*

Reactivos:

- \* Solución de hipoclorito (NaClO) al 10%.
- \* Buffer de imbibición (sacarosa al 2%, 50 mM cloruro de potasio (KCl), 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>)). Esterilizar durante 20 min a 15 psi.
- \* Agua estéril.
- \* Agarosa
- \* Solución concentrada de FB<sub>1</sub> (Sigma Chemical Co) 1 mM disuelta en acetonitrilo y agua en una relación 1:1.
- \* Solución concentrada de SN (Sigma Chemical Co) 17.91 mM disuelta en etanol absoluto.
- \* Solución concentrada de PS (Sigma Chemical Co) 1 mM disuelta en etanol absoluto.
- \* Solución concentrada de CE (Sigma Chemical Co) 8.38 mM disuelta en etanol absoluto.

### *Desinfección de los embriones de maíz*

1. Lavar 2.0 g de embriones de maíz por condición de estudio en 10% NaClO durante 2 min.
2. Enjuagar con agua estéril 3 veces durante 2 min por lavado.

### *Incubación de los embriones*

1. Preparar 25 mL de buffer de imbibición diluido con agua en una relación 1:2 (vol:vol) por cada 2 gramos de embriones de maíz.
2. Preparar una solución de agarosa al 2% y disolverla en el buffer de imbibición diluido. Esterilizar durante 20 min a 15 psi.
3. Añadir al medio de imbibición ( $\approx 40$  °C) FB<sub>1</sub> ó SN ó PS ó CE en el volumen correspondiente para alcanzar una concentración final de 100 nM o 10  $\mu$ M de acuerdo a las exigencias del experimento y vaciarlo en cajas de Petri.
4. Distribuir los embriones sobre la caja de Petri. Sellar con parafilm.
5. Incubar a 29 °C durante el tiempo requerido para cada experimento (6-24 hs).

### ***Extracción de proteínas.***

Reactivos:

- ✦ Buffer de Homogenización (250 mM sorbitol, 50 mM HEPES/BTP pH 7.8, 5 mM ditioeritritol (DTE), 1mM EDTA, 1 mM cloruro de potasio (KCl), 10 mM fluoruro de sodio (NaF), 1 mM ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cocktail de inhibidor de proteasas).

Procedimiento

1. Inmediato al término del período de incubación, congelar los embriones de maíz en nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) líquido.
2. Pulverizar a los embriones en un mortero, añadiendo constantemente  $\text{N}_2$ .
3. Añadir a los embriones pulverizados el buffer de extracción en un volumen igual al peso final de los embriones al término de la imbibición.
4. Homogenizar durante 2 minutos con el homogenizador Tissue Tearor, modelo 985-370.
5. Transferir el homogenado a tubos de centrifuga de 12 mL (Nalgene Co).
6. Centrifugar a 17 000 g durante 15 min a 4°C.
7. Extraer el sobrenadante, que corresponde a la fracción citosólica (FC).
8. Congelar a  $-70^\circ\text{C}$  en tubos eppendorff.

### ***Cuantificación de Proteínas de la fracción citosólica***

#### ***Precipitación de las proteínas de la fracción citosólica***

Soluciones:

- ✦ Mezcla de etanol absoluto (Et-OH)-acetona relación 1:1 (vol:vol)
- ✦ 1% SDS

Procedimiento:

Añadir 50  $\mu\text{L}$  de fracción citosólica a 250  $\mu\text{L}$  de la mezcla Et-OH-acetona 1:1 (vol:vol) e incubar durante 1 hora a  $-20^\circ\text{C}$ .

Transcurrido el periodo de tiempo antes mencionado, centrifugar a máxima velocidad en una microcentrifuga durante 10 minutos.

Extraer el sobrenadante y resuspender en 50  $\mu\text{L}$  de una solución 1% SDS.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado por Peterson (Peterson, 1977).

Reactivos requeridos:

- \* 0.15% Desoxicolato de sodio (NaDOC)
- \* 10% dodecil sulfato de sodio (SDS)
- \* 0.8 N Hidróxido de sodio (NaOH)
- \* Reactivo de Folin-Ciocalteu

Soluciones requeridas:

- \* Sol. Carbonato-tartrato-cobre (CTC): 10% carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 0.1% sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4$ ) y 0.2% tartrato de sodio-potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ).
- \* Sol. A: 25% CTC, 25% NaOH, 25% SDS.
- \* Sol. B: Reactivo de Folin-Ciocalteu +  $\text{H}_2\text{O}$  1:5 (vol:vol).
- \* Sol. de Albúmina Sérica Bovina (BSA), a una concentración de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Curva de calibración de albúmina sérica bovina

1. Preparación de la serie (Ver seguimiento de la tabla anexa).
2. Esperar 30 min.
3. Leer las muestras a 750 nm.
4. Calcular la absorbencia real de las lecturas de las muestras considerando el valor del blanco.
5. Graficar los valores de absorbencia corregidos contra los  $\mu\text{g}$  de BSA correspondientes.

Curva de calibración de proteína empleando BSA como estándar.

Muestra No.	mL de agua	$\mu\text{L}$ BSA	mL NaDOC 10%	ML Reactivo A	mL Reactivo B
Blanco	0.90	-	0.1	1.0	0.5
Blanco	0.90	-	0.1	1.0	0.5
1	0.90	10	0.1	1.0	0.5
2	0.90	20	0.1	1.0	0.5
3	0.90	30	0.1	1.0	0.5
4	0.90	40	0.1	1.0	0.5
5	0.840	60	0.1	1.0	0.5
6	0.820	80	0.1	1.0	0.5
7	0.800	100	0.1	1.0	0.5



Cuantificación de proteínas de las fracciones citosólicas.

1. Preparación de muestras (por triplicado).

Muestra No.	mL de agua	$\mu\text{L}$ de F. C.	mL NaDOC 10%	mL Reactivo A	mL Reactivo B
Blanco	0.90	-	0.1	1.0	0.5
Blanco	0.90	-	0.1	1.0	0.5
Muestras	0.90	3	0.1	1.0	0.5

2. Leer las muestras a 750 nm.

3. calcular la absorbencia real de cada lectura.

4. Promediar los valores ajustados del triplicado de cada muestra.

5. Interpolar en la curva de calibración de BSA los valores de absorbencia corregidos de las muestras, con el fin de determinar la cantidad de proteína presente en las fracciones citosólicas.

6. Considerar el factor de dilución para obtener la cantidad de proteína por unidad de volumen.

**Separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilmida-SDS (Schägger y von Jagow, 1987)**

Preparación del gel SDS-PAGE, 1.5 mm de grosor

Soluciones y/o reactivos	Gel separador ( $\mu\text{L}$ )	Gel concentrador ( $\mu\text{L}$ )
Acrilamida-bis acrilamida (10.0-0.3%)	2315.65	330.5
Amortiguador del gel (3 M Tris-0.3% SDS), pH 8.9	2315.65	619.7
Glicerol	936.8	-
Agua	1406.2	1527.2
Persulfato de amonio (10%)	23.41	23.41
TEMED	2.34	2.34

Soluciones:

Amortiguador del cátodo (0.1 M Tris, 0.1 M Tricina, 0.1% SDS).

Amortiguador del ánodo (0.2 M Tris-HCl, pH 8.9).

Estándar de proteínas GIBCO BRL.

Procedimiento:

1. Montaje de la cámara de electroforesis: Ensamblar las placas de vidrio, las cuales son separadas por espaciadores del grosor requerido.
2. Montar sobre el soporte de la cámara y verificar que no existan fugas.

- Preparar el gel separador y verterlo entre las placas de vidrio. Al finalizar, añadir agua para evitar la formación del menisco característico de las sustancias líquidas. Dejar polimerizar durante 30 min.
- Transcurrido el tiempo de polimerización, preparar el gel concentrador y adicionarlo entre las placas. Inmediatamente, colocar un peine para la formación de carriles del espesor correspondiente al de los espaciadores y dejar polimerizar durante 30 min.
- Ensamblar la cámara de electroforesis y adicionar dentro de la cámara buffer del cátodo para verificar que no haya fugas.
- Cargar las muestras preparadas con solución digestora de acuerdo a las características del experimento.
- Al término del paso anterior, terminar de añadir el buffer del cátodo hasta el límite de la cámara y el buffer del ánodo fuera de ésta.
- Conectar la cámara a la fuente de poder y correr el gel a 50 V durante la primera hora y a 90 V hasta la salida del frente de corrido.
- Al término de la corrida, apagar la fuente de poder y transferir los geles a la solución fijadora (10% ácido acético, CH<sub>3</sub>COOH) para su posterior tinción.

#### **Tinción de los geles con azul de Coomassie**

Solución	Fijadora	Teñidora	Desteñidora
Duración	Toda la noche	4 horas	Con esponja 1.5 horas
Composición	10% CH <sub>3</sub> COOH	39.4%(v/v) metanol (Me-OH) 21% (v/v) CH <sub>3</sub> COOH 0.16% (p/v) azul de Coomassie Brillant blue G-250	45.5 % Et-OH 9.1% CH <sub>3</sub> COOH

#### **Procedimiento para el secado de geles por tratamiento térmico y de vacío:**

- Colocar el gel teñido sobre una hoja de papel absorbente 3M previamente humedecido, y colocar una hoja de papel celofán sobre el gel. Eliminar burbujas.
- Introducir el gel preparado al equipo de secado.
- Encender la bomba de vacío y posteriormente el secador eléctrico.
- Secar a 80 °C durante 2.5 h.

### **Exposición de los geles**

1. Dentro del cuarto oscuro, colocar en el interior del cassette el gel previamente secado y un par de placas de autorradiografía X-Omat, sensibles al azul, marca Kodak, de las mismas dimensiones que la superficie del cassette.
2. Envolver al cassette en una bolsa negra y almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante un par de días o más, dependiendo de la vida media de  $\text{AT}^{32}\text{P}$ .

### **Revelado de las películas autorradiográficas.**

1. Equilibrar los cassetts durante 30 minutos a temperatura ambiente.
2. En el cuarto oscuro, extraer la placa del interior del cassette y sumergirla en solución reveladora marca Kodak GBX al 18%, agitando constantemente hasta la aparición de las manchas (sin superar los 5 min).
3. Lavar con agua para retirar el exceso de solución y sumergirla ahora en solución fijadora marca Kodak GBX al 18%, sin dejar de agitar hasta el tiempo necesario.
4. Secar la placa revelada.

### **Digitalización de la autorradiografía**

1. Encender los equipos Fluor-S y de cómputo.
2. Colocar sobre la superficie del Fluor-S la autorradiografía a analizar, procurando centrarla en el equipo.
3. Abrir el programa Quantity One para acceder al subprograma Fluor-S y obtener la pantalla de adquisición.
4. Seleccionar los siguientes parámetros:

Tipo de muestra: Rayos X

Dimensiones de la muestra: Por default

Tiempo de adquisición: Se ajusta de acuerdo a la imagen prevista

5. Una vez ajustados los parámetros se adquiere la imagen y se guarda el documento para su análisis posterior.

### **Lectura de densidad.**

1. Abrir el documento para tener acceso a la imagen digitalizada.

2. Seleccionar las bandas fosforiladas deseadas, una por una, nombrándolas e indicando el tipo de muestra a la que pertenecen, es decir, si son desconocidas o si corresponden al fondo.
3. Desplazarse al ícono de análisis de densidad para seleccionar los siguientes parámetros: tipo de muestra, nombre, área y densidad de la muestra.
4. Obtener la tabla de datos de densidad y restarles a los valores de densidad de las muestras, el valor de densidad del fondo.