

00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

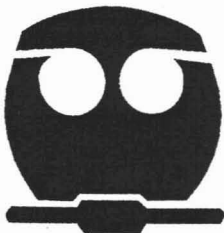
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**EFFECTO DE ESFINGOLÍPIDOS EN LA EXPRESIÓN DEL
GEN DE LA GLICOPROTEÍNA RICA EN
HIDROXIPROLINA DE MAÍZ**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :
NAHIELI GREAVES FERNÁNDEZ**



Tutor: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

México, D.F.

Junio 2005

m345312



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.

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

FECHA: 14 Junio / 2005

FIRMA: Nahiel Greaves Ferrández

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por:

Dra. Gladys I. Cassab López.	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Felipe Cruz García.	Facultad de Química, UNAM
Dr. Javier Plasencia de la Parra.	Facultad de Química, UNAM

El Jurado para el examen de grado estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Jorge Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Irma Bernal Lugo	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Gladys Cassab López	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo se realizó con apoyos de los proyectos:

DGAPA-PAPIIT-UNAM (IN208300)

CONACYT (40311-Q)

UCMEXUS (CN-03-118)

Durante los estudios de Maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT (No. de registro 167249) y de DGEP-UNAM

Se agradece el apoyo técnico de la M.C. Manuela Nájera Martínez en el desarrollo de técnicas de Biología Molecular.

Se reconoce el apoyo técnico de la Q. Laurel Fabila Ibarra.

Muchas gracias

A mis papás, por todo su apoyo y amor.

A Jiro, por compartir su vida conmigo y apoyarme siempre.

A Luis Alberto, por su compañía y apoyo.

A Javier Plasencia, por todas sus enseñanzas y su paciencia.

A Andrea, Diana, Chelo, Erika, Laura, Maru, Manuela, Mariana Rivas, Mariana Saucedo, Nora, Silvia y Marina, por el apoyo, los consejos y el tiempo compartido.

A Bego y Santiago, por su interés constante y su amistad incondicional.

A mis maestros, por su dedicación y enseñanzas.

A la UNAM, por dar siempre desinteresadamente y haberme abierto las puertas en muchas ocasiones.

Tabla de Contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE MAÍZ _____	1
1.1 <i>Embrión</i>	1
2. GERMINACIÓN _____	2
2.1. <i>Definición</i>	2
2.2. <i>Toma de agua</i>	2
2.3. <i>Respiración</i>	4
2.4. <i>Movilización de reservas</i>	6
2.5. <i>Crecimiento de los órganos del embrión</i>	6
2.6. <i>Metabolismo</i>	7
3. ESFINGOLÍPIDOS _____	9
3.1. <i>Estructura de los esfingolípidos</i>	9
3.2. <i>Los esfingolípidos en plantas</i>	11
3.3. <i>Síntesis de esfingolípidos</i>	12
3.4. <i>Funciones de los esfingolípidos en animales</i>	18
3.5. <i>Funciones de los esfingolípidos en plantas</i>	24
3.6. <i>Herramientas para el estudio de los esfingolípidos</i>	28
4. MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS _____	36
4.1. <i>Introducción</i>	36
4.2. <i>Mecanismos de defensa de las plantas</i>	36
5. EL REFORZAMIENTO DE LA PARED CELULAR COMO MECANISMO DE DEFENSA Y LA GLICOPROTEÍNA RICA EN HIDROXIPROLINA _____	43
5.1 <i>La pared celular</i>	43
5.2 <i>Composición de la pared celular</i>	44
5.3 <i>Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs)</i>	47
II. ANTECEDENTES INMEDIATOS	55
III. HIPÓTESIS.....	56
IV. OBJETIVO GENERAL	57
V. OBJETIVOS PARTICULARES	57
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	58
1. Material Biológico _____	58

2. Elaboración de las curvas de germinación de semillas de maíz en ausencia y presencia de FB1 y determinación de la longitud del coleoptilo y de la radícula	58
3. Método para la extracción de bases esfingoideas con acetato de etilo	59
4. Cuantificación de bases esfingoideas	60
5. Extracción de RNA total	61
6. Preparación de DNA de plásmidos (miniprep)	62
7. Cuantificación de DNA por espectrofotometría	63
8. Método de digestión de plásmidos	63
9. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	63
10. Marcaje de la sonda con [³² P]-dCTP por la técnica de random primer	64
11. Elaboración de un gel desnaturizante	64
12. Northern Blot	65
13. Ensayo de transcriptasa reversa – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	67
14. Preparación de células competentes	69
15. Ensayo de ligación del inserto	70
16. Transformación de células competentes	71
17. Secuenciación del DNA plasmídico	71
VII. RESULTADOS	72
1. Efecto de la fumonisina B1 sobre la germinación de embriones de maíz	72
2. Efecto de la FB1 sobre el crecimiento de la radícula y del coleoptilo en semillas de maíz	73
3. Efecto de la FB1 sobre los niveles de bases esfingoideas en embriones de semillas de maíz durante la germinación.	74
4. Efecto de la FB1 en los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz durante la germinación	77
5. Efecto de la esfingalina en los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz durante la germinación	79
6. Efecto de la ceramida sobre los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz expuestos durante la germinación	80
7. Efecto de inhibidores de la síntesis de bases esfingoideas en los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz durante la germinación	81
8. Estrategias para la determinación del origen de los transcritos de HRGP en ejes embrionarios de maíz	84
8.1 Southern Blot	84

8.2	<i>Búsqueda de la secuencia del intrón en un banco de EST (Expressed Sequenced Tags) en un banco de maíz.....</i>	84
8.3	<i>Utilización de una sonda específica para el 3'UTR.....</i>	86
8.4	<i>Diseño de oligonucleótidos que amplifican la secuencia del intrón.....</i>	87
8.5	<i>Secuenciación de los diferentes insertos obtenidos:.....</i>	90
8.6	<i>Alineamiento para el fragmento de 300 pb</i>	91
8.7	<i>Alineamiento de la secuencia obtenida de DNA genómico</i>	92
VIII.	DISCUSIÓN.....	95
1.	Efecto de la FB1 sobre la germinación de embriones de maíz y sobre el crecimiento de la radícula y del coleoptilo en semillas de maíz.....	95
2.	Efecto de la FB1 sobre los niveles de bases esfingoideas en embriones de semillas de maíz durante la germinación.....	98
3.	Efecto de la FB1 sobre los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz durante la germinación.....	100
4.	Efecto de los esfingolípidos en los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz durante la germinación.....	101
4.1	<i>Efecto de la esfinganina y la ceramida.....</i>	101
4.2	<i>Efecto de inhibidores de la síntesis de bases esfingoideas.....</i>	103
5.	Determinación del origen de los transcritos de la HRGP.....	104
IX.	CONCLUSIONES.....	108
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	109
XI.	APÉNDICE A.....	122
XII.	APÉNDICE B.....	125

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de la semilla de maíz.....	1
Figura 2. Patrón de absorción de agua trifásico durante la germinación.....	4
Figura 3. Patrón de consumo de oxígeno durante y después de la germinación por el embrión y por los tejidos de reserva.....	5
Figura 4. Estructura de los esfingolípidos más comunes.....	10
Figura 5. Esquema de la síntesis de esfingolípidos.....	13
Figura 6. Localización subcelular de la síntesis de esfingolípidos.....	14
Figura 7. Esquema de la señalización intracelular y extracelular por esfingosina-1-fosfato ...	21
Figura 8. Estructura de las Fumonisinias, aminopentol y palmitoilaminopentol.....	29
Figura 9. Estructura de la miriocina.....	33
Figura 10. Mecanismo de inhibición de la SPT por la β -Cl-alanina.....	35
Figura 11. Redes de señalización de la HR.....	37
Figura 12. Perfil hidropático de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la clona genómica de la HRGP de maíz.....	51
Figura. 13. Dispositivo para realizar la transferencia del RNA del gel a la membrana de nylon.	65
Figura. 14. Plásmido pGEM®-T Easy Vector de Promega.....	70
Figura 15. Efecto de la fumonisinina B1 sobre la germinación de embriones de maíz.....	72
Figura 16. Inhibición del crecimiento radicular y del coleoptilo en semillas germinadas en presencia de diferentes dosis de FB1.....	73
Figura 17. Cromatograma que muestra los tiempos de retención de las bases esfingoideas cuantificadas.....	74
Figura 18. Niveles de fitoesfingosina y esfinganina en embriones de semillas germinadas en presencia de diversas dosis de FB1.....	76
Figura 19. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a FB1 10 μ M durante la germinación.....	78
Figura 20. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a esfinganina 10 μ M durante la germinación.....	79
Figura 21. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a ceramida 10 μ M durante la germinación.....	81

Figura 22. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a diferentes dosis de β -cloroalanina (β -CA) a las 24 y 36 horas de germinación.....	82
Figura 23. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a diferentes dosis de miriocina a las 24 y 36 horas de germinación..	83
Figura 24. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a FB1 10 μ M durante la germinación utilizando una sonda específica para el extremo 3' UTR.	86
Figura 25. Esquema de la estructura del gen de la HRGP y diseño de los oligonucleótidos....	87
Figura 26. Fragmentos de DNA obtenidos a partir de RT-PCR usando RNA de ejes embrionarios germinados en presencia de FB1 10 μ M con los cebadores Fwd452 y Rev101.....	88
Figura 27. Digestión de DNA de plásmidos en los que se clonaron los productos de RT-PCR amplificados con los oligos Fwd452-Rev101.....	89
Figura 28. Alineamiento para el fragmento de 300 pb obtenido a partir de RT-PCR.....	91
Figura 29. Alineamiento de la secuencia obtenida a partir de DNA genómico de maíz.	92
Figura 30. Fragmento del extremo 3'UTR del gen HRGP.....	93
Figura 31. RT-PCR utilizando los oligonucleótidos Fwdint1 y Fwdint2 con el cebador Rev101.	93
Figura 32. Alineamiento de la secuencia obtenida para Fwdint2 y Rev101.....	94

Índice de Tablas

Tabla 1. Preparación de las curvas de calibración de fitoesfingosina, esfingosina y esfinganina.	61
Tabla 2. Mezcla para desnaturalización de RNA	65
Tabla 3. Preparación de las mezclas para la síntesis de la segunda cadena de cDNA.....	69
Tabla 4. Resumen de resultados obtenidos con los diversos cebadores.....	89
Datos obtenidos de la cuantificación de bases esfingoideas.	113
Tabla 5. Niveles de fitoesfingosina en embriones de semillas de maíz germinados en presencia de distintas concentraciones de FB1.....	113
Tabla 6. Niveles de esfinganina en embriones de semillas de maíz germinados en presencia de distintas concentraciones de FB1.....	113

RESUMEN

Los esfingolípidos se distinguen por la presencia de una base esfingoidea acilada con un ácido graso para formar la ceramida, que es la unidad estructural de esfingolípidos más complejos.

La biosíntesis de esfingolípidos se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi e inicia con la condensación de la L-serina con palmitoil-CoA, por la enzima **serina palmitoiltransferasa (SPT)**, para formar 3-ceto esfinganina que posteriormente se reduce a 3-eritroesfinganina. La enzima **esfinganina-N-aciltransferasa** cataliza la acilación de la esfinganina con un ácido graso para formar la ceramida. El paso final en la biosíntesis de esfingolípidos complejos tiene lugar en el lumen del aparato de Golgi, donde se glicosilan.

Los esfingolípidos tienen diversas funciones biológicas como mensajeros intracelulares que apenas comienzan a describirse en plantas. La **fumonisina B1** es una micotoxina que inhibe competitivamente a la esfinganina-N-aciltransferasa causando un aumento en los niveles de bases esfingoideas, lo que ha permitido estudiar la función de éstas en la respuesta de plantas contra patógenos. La FB1 causa un incremento en la expresión del gen de una glicoproteína rica en hidroxiprolina (HRGP) en ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Esta proteína contribuye a la defensa de la planta reforzando la pared celular. Debido a que los niveles de HRGP aumentan en presencia de FB1 y que este incremento está acompañado por una elevación en los niveles de bases esfingoideas, en este trabajo se analizó el efecto de los esfingolípidos en la expresión del gen de la HRGP de maíz.

Los niveles de fitoesfingosina y esfinganina en ejes embrionarios de semillas germinadas en presencia de FB1 se analizaron mediante cromatografía líquida con detección de fluorescencia. También se estudiaron los efectos de esta toxina sobre la elongación radicular y del coleoptilo. La FB1 inhibió la elongación radicular en un 20% a las 48 horas y en 40% a las 72 horas, así como la elongación del coleoptilo en un 35% a partir de las 72 horas de germinación. A las 48 horas de germinación, la concentración de fitoesfingosina fue aproximadamente 10 veces mayor en semillas germinadas en presencia de FB1 (10 μ M) que en las semillas control. Las dosis de 1 y 10 μ M de FB1 causaron una elevación de 5 veces con respecto al control en los niveles de esfinganina a partir de las 48 horas de germinación.

La expresión del gen de la HRGP se analizó por Northern blot en ejes embrionario de maíz en presencia de FB1, esfinganina, ceramida, y dos inhibidores de la SPT: β -cloroalanina y

miriocina. En los embriones tratados con FB1 10 μ M se observó un incremento en la expresión de este gen desde las 12 horas de germinación. Cuando los embriones se incubaron con esfinganina, el incremento se retrasó hasta las 72 horas de germinación; cuando germinaron en presencia de ceramida se observó un incremento en la expresión con respecto al control muy discreto a las 48 horas.

La miriocina ocasionó un incremento en los niveles de expresión de la HRGP en dosis de 10 nM, comparable o mayor al inducido por la FB1 10 μ M a las 24 horas de germinación.

En los ensayos de expresión se observaron dos bandas de transcrito de la HRGP, por lo que se investigó si éstas provienen de dos genes o bien de un procesamiento alternativo de un transcrito primario.

Con base en los resultados, es posible que la inducción de la transcripción del gen de la HRGP de maíz se deba a la disminución en los niveles de esfingolípidos complejos causada por la FB1.

En los experimentos no fue posible determinar el origen de las dos bandas de transcrito de la HRGP.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ABA	Ácido abscísico
ACD	Muerte celular acelerada
AGP	Arabinogalactanas
Ala	Alanina
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosina trifosfato
β -CA	β -cloroalanina
BMS	Maíz negro dulce mexicano
° C	Grado Celcius
CAPP	Cinasa de proteínas activada por ceramida
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CoA	Coenzima A
CPK	Cinasas dependientes de calcio
DAG	Diacilglicerol
dATP	Desoxi adenosina trifosfato
DCTP	Desoxi citosina trifosfato
dGTP	Desoxi guanosina trifosfato
DMS	<i>N,N</i> -dimetilesfingosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dTTP	Desoxi timidina trifosfato
EROS	Especies reactivas de oxígeno
Esfingosina-1-P	Esfingosina-1-fosfato

EST	Etiquetas de secuencias expresadas
FB1	Fumonisina B1
Fwd	Oligonucleótido sentido
Gen R	Gen de resistencia
GIPC	Glicosil inositol fosforil ceramida
Gly	Glicina
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
GRP	Proteínas ricas en glicina
h	Hora
HR	Respuesta de hipersensibilidad
His	Histidina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HRGP	Glicoproteína rica en hidroxiprolina
Hyp	Hidroxiprolina
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IME	Incremento mediado por intrón
Int/mm ²	Intensidad/milímetro ²
IPC	Inositol fosforil ceramida
JA	Ácido jasmónico
kDa	Kilodaltones
K _M	Constante de Michaelis
Lys	Lisina
M	Molar
mg	miligramo
min	minuto

mL	mililitro
μ L	microlitro
μ M	micromolar
mM	milimolar
MAPK	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
NADPH	Nicotín adenin dinucleótido fosfato
nM	nanomolar
OPA	<i>orto</i> -ftaldialdehído
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
PKC	Proteína cinasa C
PLA2	Fosfolipasa A2
PR	Relacionado con la patogénesis
Pro	Prolina
PRP	Proteínas ricas en prolina
RE	Retículo endoplásmico
Rev	Oligonucleótido antisentido
RFLP	Polimorfismo por longitud de fragmentos de restricción
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNA _r	Ácido ribonucleico ribosomal
RNA _t	Ácido ribonucleico de transferencia
RNA _{TOTAL}	Ácido ribonucleico total
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa
S	Svedverg

SA	Ácido salicílico
Sa	Esfinganina
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDK	Cinasa dependiente de esfingosina
Ser	Serina
SK	Esfingosina cinasa
So	Esfingosina
So1P	Esfingosina-1-fosfato
SPT	Serina palmitoil transferasa
Thr	Treonina
T _R	Tiempo de retención
U	Unidades
UDP-glucosa	Uridina difosfato glucosa
UTR	Región no traducida
Val	Valina
ZmHRGP	Glicoproteína rica en hidroxiprolina de maíz

I. INTRODUCCIÓN

1. ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE MAÍZ

1.1 Embrión

El embrión maduro de la planta de maíz está formado por un eje embrionario y un cotiledón modificado llamado escutelo, que funciona como reservorio de nutrientes y que absorbe y digiere los nutrimentos almacenados en el endospermo. El eje embrionario de maíz está constituido por tres regiones diferenciadas: la radícula, el mesocotilo (región que une al eje embrionario con el escutelo) y la plúmula (apéndice donde se encuentran las primeras hojas) (Figura 1). La coleorriza y el coleoptilo cubren y protegen a la radícula y a la plúmula respectivamente, durante su emergencia en la germinación (Raven *et al.*, 1992; Bewley y Black, 1994).

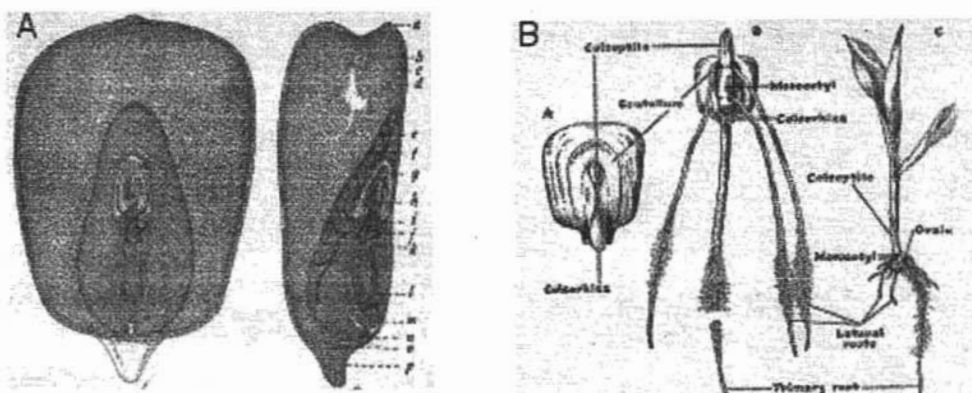


Figura 1. Estructura de la semilla de maíz. A. Corte longitudinal y lateral de una semilla de maíz mostrando las estructuras que la componen: *a)* cicatriz; *b)* pericarpio; *c)* aleurona; *d)* endospermo; *e)* escutelo; *f)* capa glandular del escutelo; *g)* coleoptilo; *h)* plúmula con tallo y hojas; *i)* primer internodo; *j)* raíz lateral seminal; *k)* nodo escutelar; *l)* raíz primaria; *m)* coleorriza; *n)* células basales conductoras del endospermo; *o)* capa café de abscisión; *p)* pedicelo. **B.** Estructuras principales durante la germinación de una semilla de maíz y su transformación a planta (Neuffer *et al.*, 1997 Foster y Gifford, 1959).

2. GERMINACIÓN

2.1. Definición

La germinación es el proceso que desencadena la rehidratación de la semilla y el inicio de la expansión de la radícula. Involucra la transición de las células de un estado de baja hidratación (< 10% de contenido de agua en semillas de maíz) y actividad metabólica a un estado hidratado de intensa actividad metabólica. Este proceso culmina con el desarrollo de la radícula, que generalmente se debe al alargamiento celular, y su penetración en los tejidos adyacentes (Flores, 1999).

Durante la germinación se reinicia la actividad metabólica y el crecimiento de los tejidos de la semilla, lo que involucra procesos de rehidratación de proteínas, cambios en las estructuras subcelulares, respiración, utilización de las reservas de nutrientes, síntesis de macromoléculas, elongación de la radícula y desarrollo gradual de los sistemas sintéticos que permitirán a la nueva planta ser un organismo autótrofo (Street y Öpik, 1986; Bewley y Black, 1994).

2.2. Toma de agua

En la semilla seca, el endospermo es un tejido relativamente duro compuesto por células muertas que representa una barrera para el crecimiento del embrión (Meyer *et al.*, 1973). Debido al bajo contenido de agua en las semillas secas (5-20%), su tasa metabólica es extremadamente pequeña comparada con la de otros tejidos de la planta que se encuentran activos y cuyo contenido de agua oscila entre el 80 y el 95%. La mayor parte del agua presente en las semillas secas se encuentra unida a coloides, por lo que no es accesible para las reacciones hidrolíticas (Street y Öpik, 1986).

La imbibición de agua es el primer requisito para la germinación de las semillas, ya que permite la reactivación metabólica y la restauración de membranas y organelos (Flores, 1999); ésta ocasiona un hinchamiento de la semilla mayor en las células del embrión que en las células muertas del endospermo, por lo que la cubierta se rompe durante la fase de hidratación (Street y Öpik, 1986).

Dentro de la semilla, el agua avanza gradualmente por capas de células, por lo que la hidratación no es homogénea. El movimiento de agua es más rápido en los tejidos embrionarios que en los tejidos de almacenamiento de nutrientes (Street y Öpik, 1986). En condiciones óptimas, la absorción de agua por la semilla se puede dividir en tres fases (Figura 2) que a continuación se describen:

- a) **Fase rápida de imbibición inicial o fase I:** El potencial de agua de la semilla seca madura es mucho menor que el del suelo circundante. Esta fase está influida por la hidratación de matrices, tales como la pared celular, almidón y cuerpos proteicos (fuerzas mátricas, Ψ_c). Durante esta etapa, el contenido de agua de la semilla se incrementa hasta un 50-60% (Flores, 1999; Street y Öpik, 1986; Bewley y Black, 1994); al hidratarse, las células y los organelos subcelulares recuperan su forma y tamaño y el citoplasma recobra su estructura normal. En esta etapa, la membrana semipermeable de las células, que normalmente retiene los solutos dentro de ellas, no actúa como barrera de retención y las células pierden iones, carbohidratos e incluso proteínas (Street y Öpik, 1986). La incorporación de algunas moléculas, tales como sacarosa u oligosacáridos de rafinosa a los fosfolípidos de la membrana plasmática, evita parcialmente la pérdida de solutos durante el inicio de la imbibición (Bewley y Black, 1994).
- b) **Fase de ingreso lento de agua o fase II:** En esta fase el componente mátrico ya no es importante y el potencial de agua de la semilla (Ψ) está dado por la concentración de solutos (potencial osmótico, Ψ_s) y por la presión de potencial Ψ_p , que permite el ingreso de agua y genera presión en la pared celular (Flores, 1999).
- c) **Fase de elongación radicular o fase III:** Tiene lugar únicamente en semillas que germinan activamente y generalmente coincide con la ruptura seminal y el comienzo del alargamiento y protrusión de la radícula. (Flores, 1999; Bewley y Black, 1994).

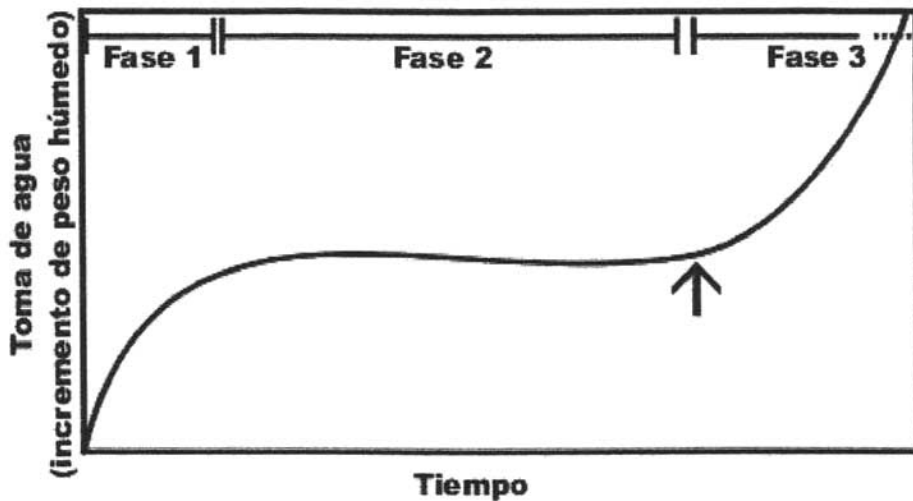


Figura 2. Patrón de absorción de agua trifásico durante la germinación. La flecha indica el tiempo en que ocurre la protrusión de la radícula (Bewley y Black, 1994).

2.3. Respiración

En las semillas secas maduras la tasa respiratoria es muy baja comparada con la de las semillas en germinación, ya que el metabolismo tan intenso de estas últimas está acompañado por tasas respiratorias muy elevadas, tanto en el embrión como en los tejidos de almacenamiento. La concentración de ATP se incrementa rápidamente en las semillas embebidas. Después de la fase de hidratación, el incremento en la respiración está asociado con el aumento de enzimas respiratorias (Street y Öpik, 1986).

Existen tres vías a través de las cuales las semillas hidratadas llevan a cabo la respiración: glucólisis, vía de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs (Bewley y Black, 1994).

Los cetoácidos (α -cetoglutarato y piruvato), intermediarios importantes en el metabolismo respiratorio, son inestables y no están presentes en las semillas secas, por lo que durante los primeros minutos de imbibición se regeneran a partir de aminoácidos a través de reacciones de desaminación y transaminación (Bewley y Black, 1994).

La respiración involucra tres fases en el tejido embrionario y cuatro fases en los tejidos de reserva de nutrientes (Figura 3):

- **Fase I:** Inicialmente hay un incremento pronunciado en el consumo de oxígeno debido a la hidratación y activación de las enzimas mitocondriales involucradas en el ciclo del ácido cítrico y en la cadena transportadora de electrones (Bewley y Black, 1994).
- **Fase II:** Es una fase de respiración lenta en la que el consumo de oxígeno se estabiliza y aumenta ligeramente. La hidratación de la semilla está completa y todas las enzimas preexistentes se encuentran activadas. Además, hay acumulación de piruvato debido a que la activación de la glucólisis es más rápida que el desarrollo de las mitocondrias (Bewley y Black, 1994).
- **Fase III:** En esta fase hay un segundo incremento respiratorio. En el embrión se debe a un aumento en la actividad de las mitocondrias recién formadas y al incremento de enzimas en las células del eje embrionario. En los tejidos de almacenamiento, la actividad de las mitocondrias también aumenta en proporción a la movilización de reservas (Bewley y Black, 1994).
- **Fase IV:** Únicamente ocurre en los tejidos de reserva de nutrientes y coincide con su senescencia y el vaciamiento de las reservas almacenadas. En esta fase finaliza la oxidación de los tejidos de reserva (Bewley y Black, 1994).

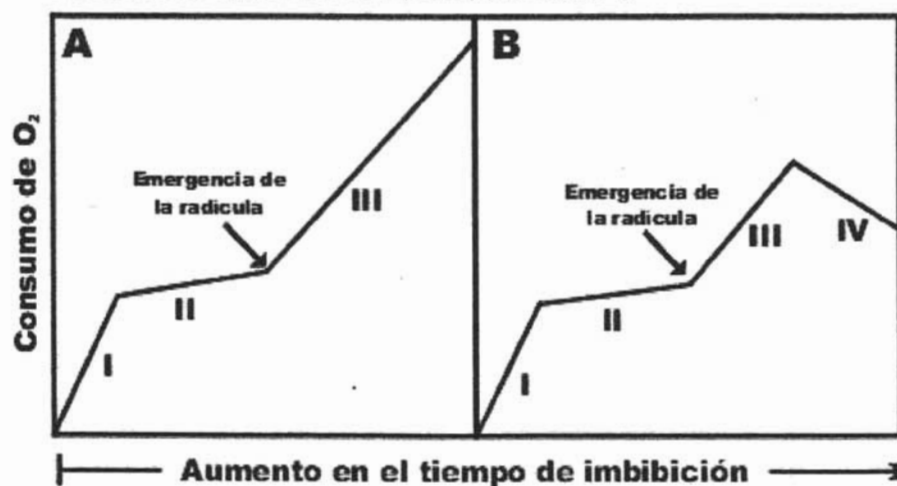


Figura 3. Patrón de consumo de oxígeno durante y después de la germinación por el embrión (A) y por los tejidos de reserva (B) (Bewley y Black, 1994).

2.4. Movilización de reservas

El metabolismo de los tejidos de reserva está encaminado hacia la hidrólisis de los nutrientes almacenados y a la translocación de los productos solubles hacia las regiones en desarrollo (Street y Öpik, 1986).

La movilización de reservas y la activación enzimática dependen de la hidratación. Las amilasas son el primer sistema enzimático involucrado en la transformación de almidón en azúcares solubles. Las lipasas degradan los lípidos a ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos son β -oxidados a acetil coenzima A, que ingresa al ciclo del glioxilato para formar carbohidratos. Algunas proteínas que también sirven como nutrientes son convertidas a formas solubles. Al inicio de la hidratación, los cuerpos proteicos forman una única vacuola central y los liposomas desaparecen debido a la hidrólisis de triglicéridos (Flores, 1999).

En el maíz, la proporción de compuestos solubles se incrementa desde un 2% inicial hasta un 25% del peso seco durante los primeros cinco días de germinación. Una porción de los productos solubles se utiliza para la respiración, pero la mayor parte se transporta hacia el embrión. El escutelo tiene una función dual, pues absorbe la glucosa y la transforma en sacarosa. La utilización de los productos de hidrólisis para la síntesis de nuevos compuestos, requiere de interconversiones de metabolitos debido a que la composición química de las nuevas células es muy diferente de la de las células del tejido de almacenamiento. La mayoría de los lípidos almacenados son convertidos en sacarosa en los tejidos de reserva (ciclo del glioxilato) y posteriormente son translocados al embrión (Street y Öpik, 1986).

2.5. Crecimiento de los órganos del embrión

El crecimiento del eje embrionario inicia con la emergencia de la radícula, precediendo el alargamiento a la división celular. Los cambios subcelulares de las células del eje embrionario implican la activación de los organelos preexistentes, la hidrólisis de reservas y el desarrollo de vacuolas. El escutelo está involucrado en la liberación de enzimas hacia el endospermo y en el transporte de metabolitos desde éste hacia el eje embrionario. La diferenciación vascular en maíz es muy rápida y al inicio de la germinación se observan xilema y floema en el escutelo, el coleoptilo y la primera hoja foliar (Flores, 1999; Milthorpe y Moorby, 1974).

El crecimiento de la raíz inicia cuando hay un relajamiento de las paredes celulares. Se ha sugerido que este relajamiento se debe a que las células en expansión secretan protones hacia la pared celular, acidificándola y rompiendo los puentes de hidrógeno entre las cadenas adyacentes de los carbohidratos que forman la pared celular; otra causa posible es la activación de enzimas hidrolíticas que tienen un pH óptimo ácido. La disminución de la rigidez de la pared permite el crecimiento de las células radiculares (Bewley y Black, 1994).

2.6. Metabolismo

El metabolismo de los tejidos de reserva de las semillas es de tipo catabólico, mientras que el del embrión es anabólico (Street y Öpik, 1986). En el endospermo de maíz se puede distinguir la capa de aleurona, metabólicamente activa, y la zona de células muertas, características de este tejido de reserva. En las semillas en reposo, las proteasas y esterasas se encuentran en la capa de aleurona y en el embrión. Durante la germinación, la capa de aleurona secreta enzimas, como α -amilasa, hacia el endospermo para la degradación de polímeros de carbohidratos (Street y Öpik, 1986). Durante las primeras 24 horas de germinación, la extensión y división de las células del embrión depende completamente del consumo de los aminoácidos, lípidos y carbohidratos almacenados (Milthorpe y Moorby, 1974).

Al inicio de la germinación predomina la glucólisis, que conduce a la formación de piruvato y a una discreta síntesis de ATP. Posteriormente, la vía dominante es la de las pentosas fosfato y se produce NADPH, que proporciona el poder reductor para la síntesis de nuevos compuestos (Bewley y Black, 1994).

Las enzimas indispensables para el metabolismo básico, como las enzimas respiratorias, se encuentran presentes en las semillas secas pero requieren de la hidratación para activarse. Por el contrario, las enzimas hidrolíticas necesarias para la degradación de nutrientes e hidrólisis de pared celular son sintetizadas *de novo* y aparecen después de la hidratación (Street y Öpik, 1986; Bewley y Black, 1994; Meyer *et al.*, 1973).

En las semillas en germinación existen dos fases de síntesis de DNA: durante las primeras horas de imbibición, se repara el daño en el DNA causado durante el secado de la semilla. Posteriormente, la síntesis de DNA se asocia con la división celular de los tejidos de los meristemos del eje embrionario (Bewley y Black, 1994).

Las semillas secas contienen RNAt y RNAm, así como RNAr en ribosomas activos. Antes de la germinación existen dos poblaciones de RNAm: los *RNAm residuales* que son necesarios para sintetizar proteínas durante la maduración de la semilla, no se requieren para la germinación y son destruidos rápidamente después de la imbibición y los *RNAm almacenados*, que se forman durante la maduración de la semilla y se encuentran disponibles para ser traducidos a proteínas al comienzo de la germinación (Bewley y Black, 1994). Poco tiempo después de la hidratación de las semillas secas, comienza la formación de polisomas y de 10 a 15 minutos después de la imbibición, la semilla es capaz de sintetizar proteínas. Sin embargo, es dentro de los primeros 30-90 minutos después de la hidratación, que las células comienzan a sintetizar RNAm. Aunque se puede llevar a cabo la síntesis de proteínas en ausencia de síntesis de RNAm al inicio de la imbibición, posteriormente se hace indispensable la síntesis *de novo* para continuar con la germinación (Bewley y Black, 1994).

Durante la germinación se expresa un gran número de genes. Dentro de los más estudiados están los genes que codifican enzimas y otras proteínas necesarias para las funciones básicas de las células, como respiración, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, síntesis de lípidos, metabolismo de nucleótidos y defensa.

En *Arabidopsis thaliana* se ha observado que los mecanismos de defensa que protegen a la plántula contra herbívoros y patógenos están presentes desde el segundo día de imbibición de las semillas.; asimismo se encontró un notable incremento en los niveles de mirosinasa y de dos proteínas de unión a mirosinasa inducibles por jasmonato durante la emergencia de la radícula. Estas proteínas están involucradas en la hidrólisis de glucosinolatos, que son un grupo de glucósidos que contienen azufre. Cuando la planta se daña, los glucosinolatos se degradan por la acción de la mirosinasa y los productos tienen efectos tóxicos para herbívoros y microorganismos (Bove *et al.*, 2001; Gallardo *et al.*, 2001). En plántulas de colza el gen COT44 que aparentemente codifica una proteasa de cisteína, se expresa en tejido vascular y en la epidermis de los cotiledones, pero no en el parénquima de almacenamiento, debido a esto, es probable que COT44 probablemente no tenga funciones de movilización de reservas sino que juega un papel en la defensa (Thomas, 1993).

Otros genes que se expresan durante la germinación son los que codifican la isocitrato liasa y malato sintasa, enzimas del ciclo del glioxilato involucradas en la movilización de lípidos de reserva en plántulas. Su expresión se ha estudiado en girasol, pepino y colza. Estas

enzimas se expresan de manera coordinada en niveles elevados en semillas de colza, en las que se acumulan principalmente en los ejes embrionarios y cotiledones (Thomas, 1993).

3. ESFINGOLÍPIDOS

Los esfingolípidos constituyen una de las clases de biomoléculas más diversas funcional y químicamente. Desde su descubrimiento por el alemán J.L.W. Tudichum en 1884, se han elucidado cientos de estructuras de esfingolípidos, así como las características básicas de su biosíntesis, transporte y recambio (Merrill *et al.*, 1993).

Los esfingolípidos ayudan a definir las propiedades de las membranas y lipoproteínas, participan en la interacción célula-sustrato y en la comunicación célula-célula, incluyendo el reconocimiento de células por algunos microorganismos, virus y anticuerpos; interactúan con receptores para afectar las respuestas celulares a factores de crecimiento y otros agonistas, influyen sistemas de transducción de señales y sirven como anclas para algunas proteínas de membrana (Merrill *et al.*, 1993).

La mayoría de las funciones biológicas de los esfingolípidos aún son desconocidas; sin embargo, actualmente se comienza a comprender la manera en que estos lípidos controlan varias funciones celulares y por qué cambian sus niveles con el crecimiento celular, la diferenciación y diversos procesos patológicos (Merrill *et al.*, 1993; Riboni *et al.*, 2002).

3.1. Estructura de los esfingolípidos

Los esfingolípidos están formados por una base de cadena larga (amino alcohol) unida por un enlace amida a un ácido graso (Fig. 4). Los esfingolípidos complejos se forman por la adición de grupos polares tales como fosfocolina o uno o más residuos de azúcar a la base *N*-acilada no polar (ceramida). Estos lípidos están presentes en la mayoría de las células eucariotes y en algunos organismos procariones. Se descubrieron en tejido cerebral en el siglo XIX y los primeros reportes de esfingolípidos en plantas se publicaron en la década de 1950 por Carter y colaboradores, que demostraron la presencia de glicoesfingolípidos complejos en extractos de semilla (Lynch, 1993).

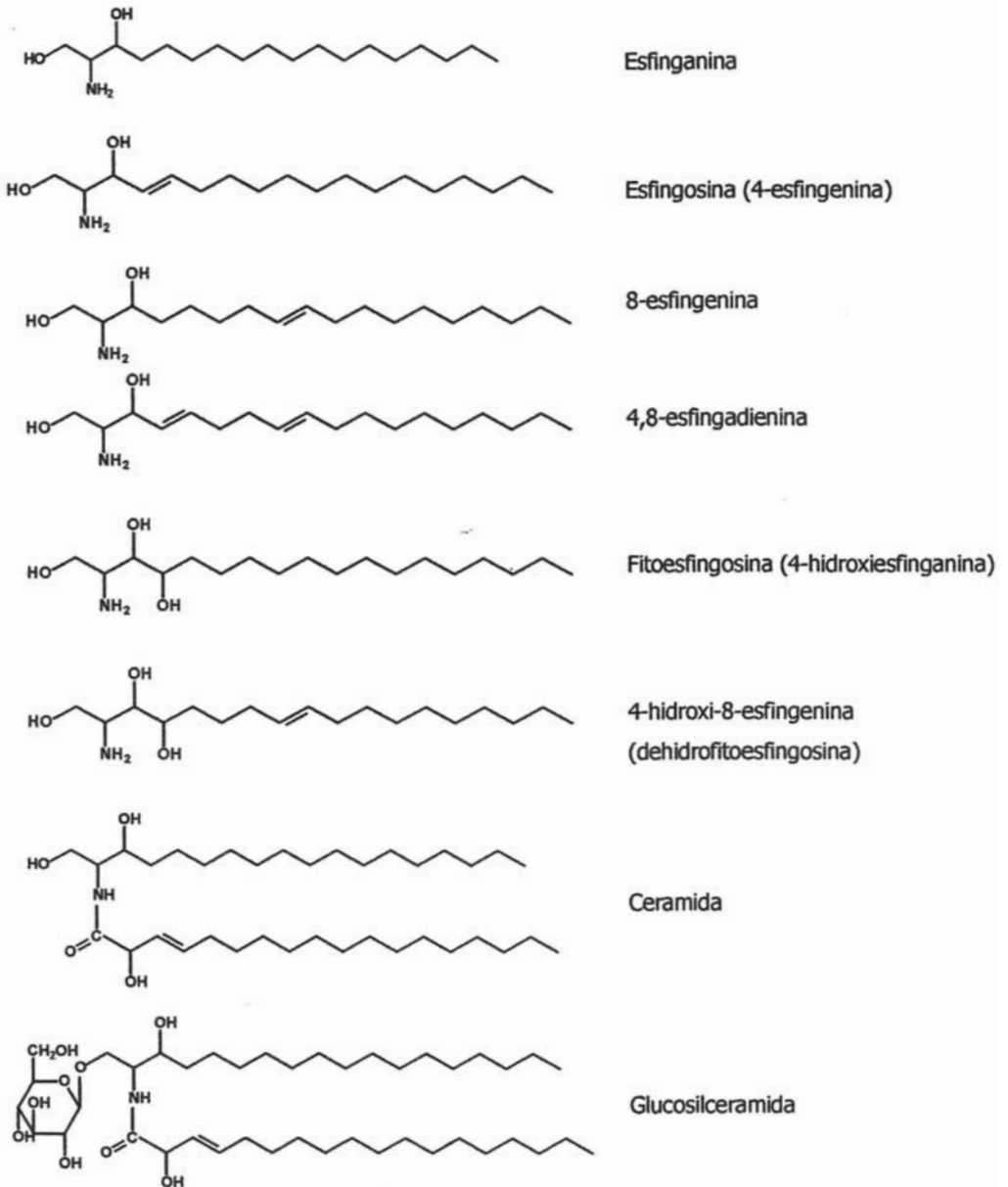


Figura 4. Estructura de los esfingolípidos más comunes.

3.2. Los esfingolípidos en plantas

Las glucosilceramidas y los esfingolípidos relacionados son componentes minoritarios en extractos lipídicos de plantas, contribuyendo con 5% o menos a la fracción lipídica. Sin embargo, en las membranas, la glucosilceramida es un componente cuantitativamente importante, que comprende del 7 al 26% en mol de los lípidos de membrana plasmática, dependiendo la concentración del tejido vegetal en estudio. En maíz, los esfingolípidos (principalmente glucocerebrósidos) constituyen el 6.8% en mol de los lípidos de la membrana plasmática. La glucosilceramida también es un componente importante de los lípidos del tonoplasto. Estas observaciones son consistentes con los sistemas de mamíferos, donde diversos esfingolípidos se localizan en la membrana plasmática y endomembranas relacionadas. En las células, los esfingolípidos se concentran en la cara externa de la membrana, expuestos en la superficie celular (Lynch, 1993; Bohn *et al.*, 2001).

Se han encontrado esfingolípidos en animales, plantas y células fúngicas y se estima que existen de 300 a 400 diferentes especies moleculares de estos lípidos. En animales, la base esfingoidea predominante es la esfingosina (Worral *et al.*, 2003).

Las bases esfingoideas más comunes en plantas son aminoalcoholes C_{18} e incluyen a las bases dihidroxiladas esfinganina (d18:0), 8-esfingenina (d-18:1^{8cis o trans}), 4,8-esfingadienina (d-18:2^{4trans,8trans o 4trans,8cis}) y las bases trihidroxiladas 4-hidroxi esfinganina (t18:0) y 4-hidroxi-8-esfingenina (t-18:1^{8cis o trans}) (Figura 4). Otras bases de cadena larga que difieren en la longitud de la cadena, número de grupos hidroxilo y número, posición y configuración estereoquímica de los dobles enlaces son constituyentes minoritarios de los esfingolípidos vegetales. Los ácidos grasos presentes en los esfingolípidos de plantas son casi exclusivamente 2-hidroxilados. Las cadenas acilo más abundantes tienen de 16 a 24 C y son saturadas, aunque en algunas plantas se encuentran cadenas C_{14} y C_{26} . En algunos cereales son comunes los ácidos grasos hidroxilados monosaturados. La glucosa es el monosacárido unido a la ceramida en casi todos los glicoesfingolípidos vegetales. La unidad de glucosa está unida por un enlace glicosídico al grupo hidroxilo del C-1 del aminoalcohol (Lynch, 1993; Sperling y Heinz, 2003).

Existen grandes diferencias entre las glucosilceramidas de diversos tejidos de plantas con respecto a la composición de su base de cadena larga y del ácido graso. Generalmente, las glucosilceramidas de tejidos de semillas están enriquecidas en ácidos grasos hidroxilados de cadena larga (C_{16} - C_{20}). Las glucosilceramidas presentes en las hojas de dicotiledóneas y

cereales están enriquecidas en bases de cadena larga trihidroxiladas y ácidos grasos de cadena muy larga saturados e insaturados (>C₂₀). La composición de glucosilceramidas en raíces es similar a la de las hojas en un gran número de plantas (Lynch, 1993). Otros esfingolípidos complejos encontrados en plantas son los que contienen inositol, derivados de la inositolfosforilceramida (IPC). Éstos se encuentran en muchos tejidos vegetales y tienen una amplia diversidad estructural. Tienen una estructura general compuesta por ceramida e inositolfosfato, así como oligosacáridos polares, tales como la *N*-acetilglucosamina, glucosamina, ácido glucurónico, galactosa, manosa, arabinosa y fucosa. En tabaco se han encontrado más de 20 especies moleculares diferentes de IPC con variaciones en el oligosacárido. Estos compuestos forman parte de las membranas plasmáticas y el tonoplasto. Sin embargo, su localización celular y su función aún no se ha determinado, aunque se ha demostrado que algunas proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), tienen esfingolípidos con fosfoinositol como sus anclas lipídicas (Bromley *et al.*, 2003).

3.3. Síntesis de esfingolípidos

La ruta metabólica para la síntesis de esfingolípidos tiene poco en común con las rutas biosintéticas de otros lípidos (Lynch, 1993) y se ha estudiado con más detalle en *Saccharomyces cerevisiae*, donde se identificaron todos los genes del metabolismo de esfingolípidos. Además, la facilidad de manipulación genética ha permitido la generación de mutantes en esta ruta. Sin embargo, en el modelo de levadura, la biosíntesis, funciones y diversidad estructural de los esfingolípidos es sumamente diferente a los sistemas vegetales. De hecho, existen divergencias en la ruta biosintética de plantas, que conducen a la formación de cerebrósidos y a glicosilinositol fosforilceramidas (GIPC) con instauraciones Δ -8 en las bases esfingoideas que no están presentes en la levadura (Sperling y Heinz, 2003; Dickson, 1998).

Los estudios del metabolismo de esfingolípidos en plantas se han enfocado en demostrar y caracterizar la actividad *in vitro* de las enzimas que participan en la biosíntesis y degradación; en los últimos años se han identificado los genes que controlan los pasos determinantes en la síntesis de estos lípidos en plantas (Sperling y Heinz, 2003).

En la figura 5 se muestra un esquema de la síntesis de esfingolípidos. Los pasos indicados en el esquema se requieren para la síntesis de todos los esfingolípidos complejos. La mayoría de los estudios de la síntesis de esfingolípidos se han realizado en animales, aunque

también existen algunos trabajos en plantas. En la actualidad aún existen muchos detalles del metabolismo de esfingolípidos y su regulación que no están bien establecidos (Lynch, 1993).

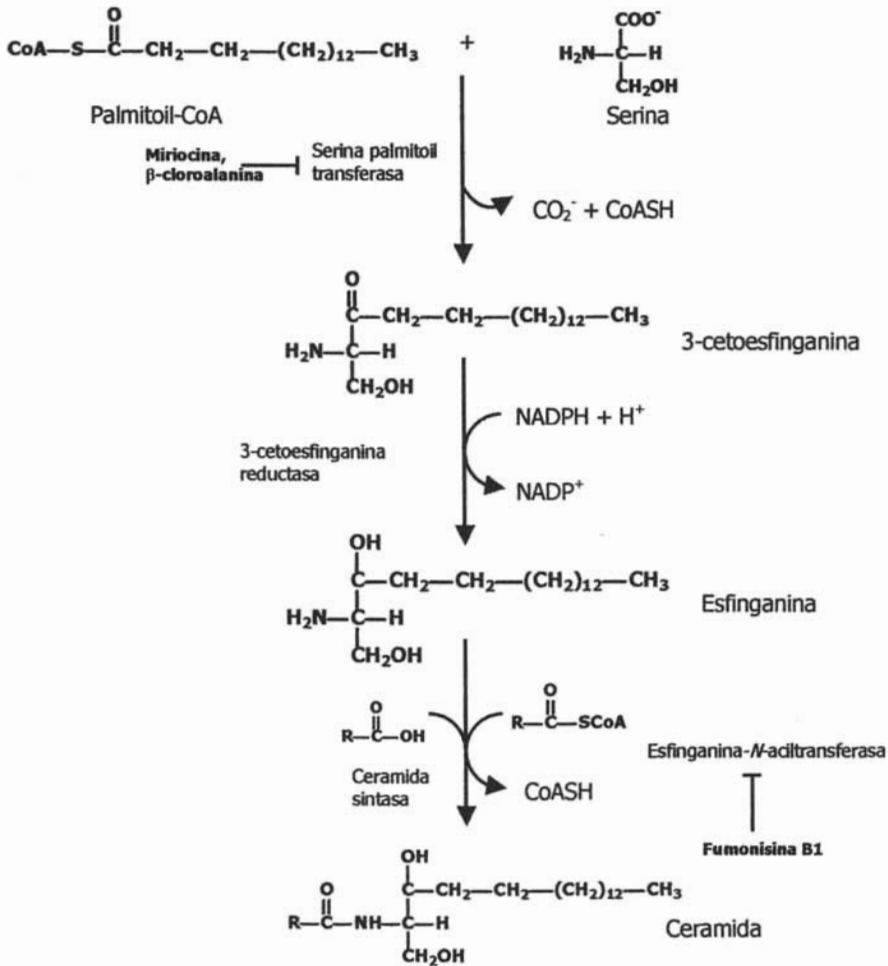


Figura 5. Esquema de la síntesis de esfingolípidos (Lynch, 1993).

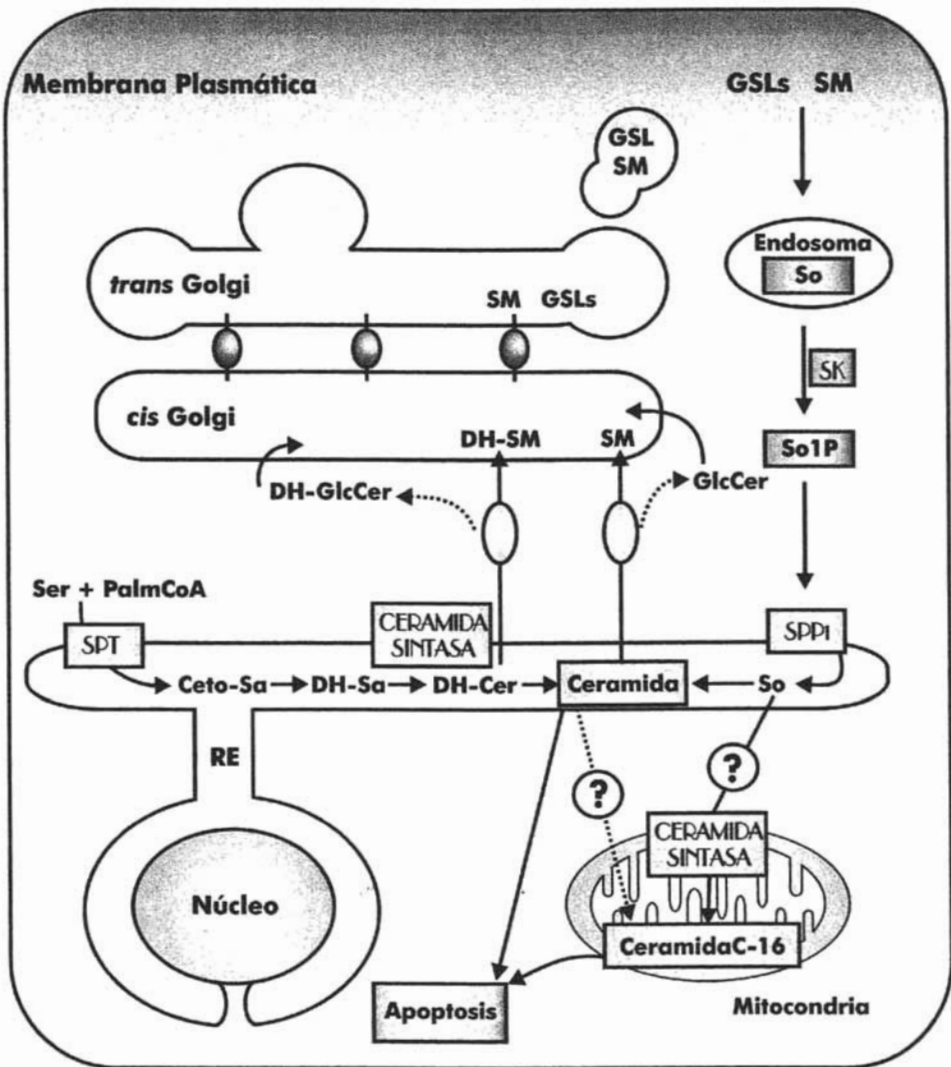


Figura 6. Localización subcelular de la síntesis de esfingolípidos. GSL, Glicosilceramidas; SM, esfingomielina; So, esfingosina; SK, esfingosina cinasa; So1P, esfingosina-1-fosfato; GlcCer, glucosilceramida; SPP1, fosfatasa de la So1P; DH-cer, dihidroceramida; Ceto-Sa, cetoesfingonina; SPT, serinopalmitoiltransferasa; Ser, serina; PalmCoA, palmitoil-coenzima A; RE, retículo endoplásmico. (Tomado de Spiegel y Milstien, 2003). Poner abreviaturas.

1. Formación de la esfinganina: La ruta biosintética de los esfingolípidos comienza con la síntesis de la base de cadena larga *esfinganina*. El primer paso es la condensación de la L-serina con palmitoil-CoA para formar 3-cetoesfinganina, reacción catalizada por la *serina palmitoil transferasa (SPT)*, que es una enzima dependiente de piridoxal 5' fosfato. Se ha propuesto que la formación de la 3-cetoesfinganina es el paso limitante de la síntesis de esfingolípidos en tejidos animales y en plantas. La enzima es un heterodímero, formado por las subunidades LCB1 y LCB2. En el genoma de *Arabidopsis* se han encontrado las secuencias putativas de ambas subunidades (Sperling y Heinz, 2003). Tamura y colaboradores (2000) aislaron y caracterizaron en *A. thaliana* el cDNA de la subunidad homóloga a LCB2 en mamíferos. Al ser expresado en *E. coli* se observó una producción significativa de esfinganina en las células bacterianas, y complementó a una mutante de *lcb2* de *S. cerevisiae* (Tamura *et al.*, 2000). En células de tabaco, la actividad de SPT se encuentra en el retículo endoplásmico y es proporcional a la concentración de esfingolípidos en los tejidos. En calabaza, la SPT tiene una K_M de 1.8 mM para palmitoil-CoA, que es el sustrato preferido sobre otros derivados de ácidos grasos, en concordancia con la composición de las bases de cadena larga en los tejidos, por lo que la SPT determina el tipo de bases esfingoideas presentes en los organismos. La K_M aparente de la enzima para la serina es similar a las concentraciones de este aminoácido reportadas en tejidos vegetales, por lo que la disponibilidad de sustrato puede tener influencia sobre la biosíntesis de esfingolípidos (Lynch, 1993). La actividad de la SPT reportada en calabaza es 20 veces mayor que la actividad de la enzima reportada en animales. También se ha detectado actividad de SPT en microsomas aislados de poro, hipocotilo de frijol, pepino, manzana, otras variedades de calabaza, tubérculos de papa y hojas de espinaca. La actividad de esta enzima puede ser inhibida por β -cloro-L-alanina, L-cicloserina, miriocina y esfingofunguina B y C (Lynch, 1993; Sperling y Heinz, 2003) como se describirá más adelante. En calabaza, la actividad de la SPT varía con el tamaño y edad del fruto, siendo los frutos inmaduros los que presentan una mayor actividad específica, que decrece conforme el fruto madura. El fenómeno de dependencia con la edad también se ha demostrado durante la elongación de hipocotilos de frijol. Estas observaciones representan evidencia indirecta de que la síntesis de esfingolípidos es regulada, al menos en parte, por

el nivel de SPT presente, que a su vez correlaciona con el nivel de crecimiento relativo del tejido (Lynch, 1993; Sperling y Heinz, 2003).

En animales, la regulación de la SPT es compleja. La actividad de la enzima en cultivos celulares es dependiente de las concentraciones de serina y ácido palmítico en el medio, mientras que otros ácidos grasos tienen acción inhibitoria. En queratinocitos con daño químico inducido, existe evidencia de que la SPT se regula en respuesta a estrés. En este caso, se ha propuesto que el incremento en la síntesis de esfingolípidos está relacionado con la reparación de la barrera de permeabilidad y se debe a una regulación transcripcional de la enzima. También se ha observado una mayor actividad de SPT en células beta pancreáticas en respuesta a exceso de ácidos grasos, en líneas celulares de carcinoma de ratón en respuesta a ácido retinoico y en respuesta a fenretinida en células de neuroblastoma. En cada uno de estos sistemas, se produjo una acumulación de ceramida y muerte celular sensibles a inhibidores de la síntesis de ceramida como consecuencia de la activación de la SPT (Perry, 2002).

La 3-cetoesfingánina formada se reduce a esfingánina en una reacción dependiente de NADPH catalizada por la *3-cetoesfingánina reductasa*. En *S. cerevisiae* esta enzima está localizada en el lado citosólico del RE. Se han encontrado en el genoma de *A. thaliana* dos genes homólogos que codifican una 3-cetoesfingánina reductasa putativa, pero aún no se ha identificado su función (Sperling y Heinz, 2003, Lynch, 1993).

2. Síntesis de ceramida: La síntesis de ceramida involucra la formación de un enlace amida por la condensación de un ácido graso con el grupo amino de la base esfingoidea. Aunque se han propuesto varios mecanismos diferentes para la síntesis de ceramida, las evidencias experimentales apoyan la existencia de dos rutas:

- i) *Mediante la actividad de la esfingánina N-aciltransferasa*, que usa acil CoA y esfingánina o esfingosina como sustratos. El ATP estimula la formación de ceramida una vez que se ha formado la acil CoA. En fracciones microsomales de calabaza e hipocotilos de frijol y maíz se ha detectado esta actividad (Lynch, 1993). En *A. thaliana* se han clonado dos cDNAs homólogos a LAG1, que es uno de los genes de la esfingánina N-aciltransferasa de levadura (Sperling y Heinz, 2003).
- ii) *Mediante la actividad inversa de una ceramidasa*. La evidencia de este mecanismo proviene principalmente del gen *ypc1* de levadura, cuyo producto sintetiza ceramida

en presencia de ácido palmítico y fitoesfingosina. Esta actividad es resistente a la fumonisina B1, que inhibe a la esfinganina *N*-aciltransferasa (Mao *et al.*, 2000). Esta actividad de ceramidasa inversa no se ha demostrado en plantas (Lynch, 1993) y aunque se ha identificado una secuencia homóloga a *ypc1* en el genoma de *A. thaliana*, aún no se ha clonado el gen o el cDNA (Sperling y Heinz, 2003).

Es posible que la reacción dependiente de esfinganina-*N*-aciltransferasa se encuentre involucrada en la síntesis *de novo* de ceramida, mientras que la ceramidasa inversa actúe en la vía de salvamento de ácidos grasos y bases esfingoideas, ya que ambos compuestos son citotóxicos aun en bajas concentraciones (Lynch, 1993 Sperling y Heinz, 2003).

Las ceramidas vegetales componen un grupo muy diverso, pues se pueden dar varias combinaciones entre más de 10 ácidos grasos (generalmente α -hidroxilados) con 8 diferentes bases esfingoideas (Sperling y Heinz, 2003).

3. Formación de glucosilceramida: La ceramida es el precursor de los esfingolípidos complejos y la modificación más común de las ceramidas vegetales es la adición de glucosa para generar glucosilceramidas. En animales, la glucosiltransferasa utiliza uridina-difosfato-glucosa (UDP-glucosa) como donador de glucosa y ceramida no hidroxilada como sustrato preferente, en contraste con la galactosiltransferasa, que utiliza preferencialmente hidroxiceramidas. La reacción de glucosilación se puede estimular con Mg^{2+} o Mn^{2+} (Lynch, 1993).

4. Modificación de las bases esfingoideas: La esfinganina se modifica por deshidrogenación y/o insaturación para formar las bases C_{18} encontradas en animales y plantas. Aparentemente, la modificación de las bases esfingoideas ocurre simultáneamente con la síntesis de esfingolípidos. Tanto en animales como en plantas, existen evidencias que sugieren que la *N*-acilesfinganina es el sustrato para la inserción del doble enlace en la base esfingoidea, para formar *N*-acilesfingosina (Lynch, 1993).

Las plantas superiores difieren de los animales y levaduras, ya que contienen dos enzimas distintas que introducen dobles enlaces en las bases esfingoideas. Estas enzimas son la Δ^8 -desaturasa y la Δ^4 -desaturasa (Dunn *et al.*, 2004). En *A. thaliana* se han identificado los genes putativos de la Δ^4 -desaturasa y de la Δ^8 -desaturasa y la primera

también se encontró en *L. esculentum*. Asimismo, se identificaron y caracterizaron dos genes que codifican la C-4-hidroxilasa de esfingolípidos de *Arabidopsis* (Warnecke y Heinz, 2003).

3.4. Funciones de los esfingolípidos en animales

En mamíferos y levaduras, los esfingolípidos están implicados en diversos fenómenos celulares que incluyen crecimiento, proliferación celular, respuestas a estrés y apoptosis, además de ser marcadores de progreso de tumores y diferenciación celular. También son componentes clave de los microdominios membranales llamados balsas lipídicas, que se cree son responsables de la organización de componentes de señalización localizados en la membrana (Worral *et al.*, 2003; Hannun, 1996). Los esfingolípidos tienen una función esencial en la viabilidad celular, ya que tanto en *S. cerevisiae* como en células de mamíferos, las mutaciones en la primera enzima de la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos (serina palmitoil transferasa, SPT) resultan en una disminución de la formación de esfingolípidos y pérdida de viabilidad que se reconstituye con la aplicación de esfingolípidos exógenos o la transformación con la enzima (Hannun, 1996; Jenkins *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que muchos microorganismos, toxinas y virus se unen a las células por medio de los esfingolípidos, por lo que se han empleado esfingolípidos sintéticos como fármacos para evitar la unión de virus y bacterias. Se sabe también que existen esfingolípidos que participan en los mecanismos de infección de diversos patógenos (Vesper *et al.*, 1999).

Existe evidencia de que la actividad biológica de las bases esfingoideas es dependiente de su estructura química. La capacidad para interactuar con sus blancos estriba principalmente en la estructura de la cadena hidrocarbonada; se sabe que 18 átomos de carbono es la longitud óptima para la inhibición de PKC. Los esfingolípidos de mayor o menor tamaño tienen efectos inhibitorios menores. La configuración del doble enlace también juega un papel importante en la actividad biológica, ya que se sabe que el reemplazo del isómero-*trans* de la *D-eritro*-esfingenina por su forma *cis* disminuye a la mitad la capacidad de inhibir a la PKC. Tanto las insaturaciones como los grupos funcionales (hidroxilo y amino) desempeñan un papel crítico en la función de los esfingolípidos (Dyatlovitskaya, 1997).

3.4.1. Esfingosina y esfinganina

El hecho de que la esfingosina sea un potente inhibidor de la proteína cinasa C (PKC, enzima clave en la regulación de procesos como la proliferación, diferenciación y apoptosis) *in vitro* y de las respuestas celulares a PKC en más de 100 sistemas celulares diferentes, tales como plaquetas, neutrófilos y células HL-60, dio la pauta para proponer a este esfingolípido como un "segundo mensajero lipídico". Actualmente se sabe que hay un gran número de esfingolípidos que pueden inducir respuestas celulares y ser segundos mensajeros, tales como las ceramidas, esfingosina-1-P, lisoesfingolípidos, *N*-metilesfingosina, entre otros (Merrill *et al.*, 1993, Alessenko, 1997, Merrill *et al.*, 1997).

La esfingosina y otras alquilaminas son inhibidores potentes de la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico, enzima responsable de la formación de diacilglicerol como intermediario de la biosíntesis de esfingolípidos y la vía de transducción de señales que utiliza a la fosfolipasa D (Merrill *et al.*, 1993).

La esfingosina activa a una fosfolipasa D específica de fosfatidiletanolamina, relacionada con la transducción de señales en la mitogénesis, así como a la fosfolipasa C δ . Este esfingolípido es capaz de inducir la liberación de calcio de depósitos intracelulares en células musculares permeabilizadas con saponina (Merrill *et al.*, 1993; Merrill *et al.*, 1997).

La esfingosina y la *N,N*-dimetilesfingosina (DMS), son potentes activadores de proteínas cinasas dependientes de esfingosina (SDK1-SDK3), que fosforilan varias proteínas celulares, como las proteínas 14-3-3 (isoformas β , η y ζ , pero no τ o σ) que están involucradas en la interacción y modificación funcional de moléculas clave en la transducción de señales asociada con proliferación, diferenciación y apoptosis. También activa a la chaperona calreticulina, la proteína disulfuro isomerasa y diversas proteínas de choque térmico. Es posible que la esfingosina regule eventos de transducción de señales por su capacidad para activar a dichas chaperonas (Megidish *et al.*, 1999; Hamaguchi *et al.*, 2003).

En células HL-60 (promieloblastos humanos) y U937 (linfoblastos humanos), la exposición a esfingosina o a esfinganina (0.001-10 μ M) promueve la degradación del DNA genómico. A concentraciones menores (750 nM), las bases esfingoideas aumentan de manera sinérgica la capacidad de la ceramida para producir apoptosis (Jarvis *et al.*, 1996).

La *esfinganina*, el precursor de la ceramida en la vía *de novo* de esfingolípidos, juega un papel en la apoptosis y en la muerte celular. La SPT está involucrada en la detención del ciclo celular y las respuestas apoptóticas en *Saccharomyces cerevisiae* y en células de

mamífero respectivamente y se sabe que el papel de la vía *de novo* de síntesis de esfingolípidos es estímulo-específico. Diversos tipos de estrés regulan a la SPT a nivel transcripcional o post-transcripcional (Wispriyono *et al.*, 2002).

3.4.2. Esfingosina-1-fosfato (So1P)

La esfingosina-1-fosfato es un metabolito formado por la fosforilación de la esfingosina en la posición 1 por la *esfingosina cinasa*, que es una enzima que en su estructura primaria contiene secuencias de unión a calcio/calmodulina y sitios potenciales de fosforilación por caseína cinasa II y PKC. Es estimulada por activadores de PKC y se inhibe por *N,N*-dimetilesfingosina. La So1P se une a la albúmina y está ampliamente distribuida en tejidos de mamíferos. Se libera por la activación de plaquetas y otras células, daño tisular, inflamación y neoplasia, y evoca respuestas celulares dependientes del citoesqueleto, como contracción, secreción, adhesión y quimiotaxis. La So1P es más polar que la esfingosina y se puede encontrar en el citosol. Es degradada por la So1P liasa para generar fosfoetanolamina y hexadecanal. La So1P se puede unir a receptores membranales acoplados a proteínas G, por lo que puede actuar como un mensajero extracelular y posiblemente como un segundo mensajero intracelular, lo cual explicaría la diversidad de procesos biológicos en los que está involucrada (Fig. 7) (Payne *et al.*, 2002, Hla, 2003; Goetzl y An, 1998; Pyne y Pyne, 2000).

En *Saccharomyces cerevisiae* y *Dictyostelium discoideum* la eliminación del gen de la esfingosina cinasa (SK, genes *Lcb4* y *Lcb5*), resultó en la acumulación de bases de cadena larga como la fitoesfingosina, asociada con una disminución en la supervivencia de las levaduras a estrés por calor. Al eliminar la fosfatasa y la liasa se incrementaron los niveles de fitoesfingosina-1-fosfato, aumentando la supervivencia a estrés por calor. En *D. discoideum* ocurrieron efectos dramáticos en la interacción célula-célula y en la diferenciación a estructuras multicelulares. Estos datos sugieren que las bases de cadena larga como la fitoesfingosina pueden ser tóxicas para la célula y la fosforilación reduce la toxicidad. Otra posibilidad es que la fitoesfingosina-1-fosfato esté directamente involucrada en una vía de señalización que regule la supervivencia celular en respuesta a estrés (Hla, 2003).

Se ha postulado que la So1P puede desempeñar un papel crítico en la regulación de la vía *de novo* de esfingolípidos afectando a la SPT o a la esfingonina-*N*-aciltransferasa (Payne *et al.*, 2002; Merrill *et al.*, 1997; Le Stunff *et al.*, 2002).

Las funciones extracelular e intracelular de la So1P se ilustran en la siguiente figura:

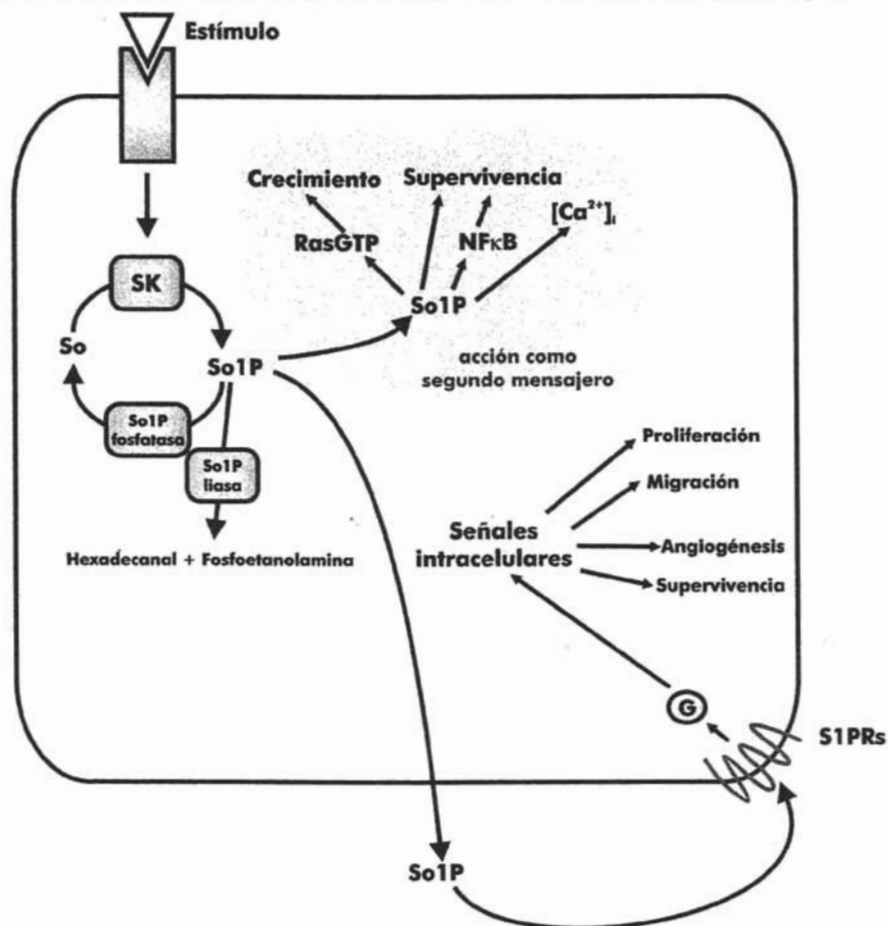


Figura 7. Esquema de la señalización intracelular y extracelular por esfingosina-1-fosfato So1P, esfingosina-1-fosfato; PR, proteína relacionada con la patogénesis; SK, esfingosina cinasa. (Adaptado de Pyne y Pyne, 2000 y Spiegel y Milstien, 2003).

3.4.3. Ceramida

Las ceramidas son una familia de moléculas altamente hidrofóbicas que contienen un ácido graso de longitud variable unido a una molécula de esfingosina o a una base relacionada de cadena larga (Ruvolo, 2003).

Se sabe que la ceramida desempeña un papel estructural, ya que puede influenciar el acomodo de lípidos en la membrana y afectar su permeabilidad, pues forma poros que permiten la salida de moléculas de 20 a 60 kDa. Asimismo, se sabe que dentro de las membranas existen regiones ricas en ceramida que pueden conformar microdominios importantes en la señalización. La localización y organización de los microdominios de señalización es crítica para los mecanismos de operación de las cascadas de señalización activadas por estrés (Ruvolo, 2003).

La ceramida puede modificar la actividad de diversas proteínas por varios mecanismos (Ruvolo, 2003):

- a) Promoviendo una mayor actividad de algunas enzimas
- b) Reclutando las cinasas adecuadas en el sitio correcto de la membrana
- c) Interfiriendo con la unión de los ligandos
- d) Promoviendo la formación de complejos de señalización

Se sabe que la ceramida activa a una fosfatasa de serina/treonina, llamada *fosfatasa de proteínas activada por ceramida* (CAPP), que es independiente de cationes y sensible a la inhibición por ácido okadaíco. CAPP se puede activar por diferentes ceramidas con unidades hidrofóbicas distintas pero no por otros esfingolípidos ni lípidos neutros. Chalfant y colaboradores (2004) estudiaron los requisitos estructurales para la interacción entre y ceramida y CAPP y determinaron que la *D-eritro-C(6)* ceramida activa la subunidad catalítica de CAPP (PP2Ac) aproximadamente al triple, de una manera estereoespecífica. Por el contrario, al saturar el doble enlace 4-5, produciendo *D-eritro-cis-C(6)* ceramida, esta subunidad es inhibida ($IC_{50}=8.5\mu M$). La fito C(6) ceramida no tuvo efecto en la actividad de la proteína. Al modificar la base esfingoidea, la capacidad de la ceramida para activar a CAPP desapareció. Asimismo demostraron que el grupo amida y los grupos hidroxilo primario y secundario de la base esfingoidea son indispensables para la activación.

Existe evidencia que sugiere un papel de CAPP como mediador de algunas de las funciones de la ceramida: la apoptosis inducida por ceramida se inhibe por bajas

concentraciones de ácido okadaico; CAPP se activa *in vitro* por ceramida, pero no por dihidroceramida, que es inactiva para elicitar los efectos de la ceramida en las células; estudios en levaduras deficientes en las subunidades de CAPP son resistentes a los efectos de la ceramida (Hannun, 1996).

La ceramida también es capaz de activar a cinasas de proteína, entre ellas a PKC ζ y a una cinasa dependiente de magnesio que fosforila al receptor del factor de crecimiento epidérmico en la treonina 699 (Merrill *et al.*, 1993; Hannun, 1996).

Una cinasa de proteínas activada por ceramida fosforila a RAF1, incrementando su actividad y promoviendo la activación de una cascada de MAP cinasas. Esta activación puede conectar a la vía de señalización por ceramidas con otras moléculas de señalización intracelular (Merrill *et al.*, 1997).

3.4.4. Ceramida-1-fosfato

La ceramida-1-P está implicada en la regulación de varias funciones, incluyendo la secreción de neurotransmisores, proliferación celular, apoptosis, fagocitosis y tono vascular. Actualmente, el conocimiento sobre las funciones de la ceramida-1-P en animales es escaso. Se ha reportado la actividad de la ceramida cinasa en el cerebro, células HL-60, células de riñón A498, neutrófilos y vesículas de neuronas sinápticas. La ceramida-1-P se forma en estas células tanto a partir de la acilación y fosforilación de la esfingosina como de la degradación de esfingomielina. Se sabe que la actividad de la ceramida cinasa cambia dependiendo del tipo de tejido y el estado de diferenciación de éste (Huwiler *et al.*, 2000; Riboni *et al.*, 2002). Se ha caracterizado a la ceramida cinasa humana. El gen codifica una proteína de 537 aminoácidos que tiene una región catalítica muy similar al dominio catalítico de la cinasa de diacilglicerol. La proteína tiene un sitio putativo de *N*-miristoilación en su amino terminal. Al transformar células HEK293 (células de riñón de embrión humano) con la ceramida cinasa se encontró actividad en la fracción membranal y no en la citosólica. Esta enzima fosforila ceramida pero no esfingosina u otras bases esfingoideas, diacilglicerol o fosfatidilinositol. Los valores de K_M de la enzima son 187 y 32 μ M para la ceramida y ATP respectivamente. El RNAm de la ceramida cinasa humana se expresa en altos niveles en el cerebro, corazón, músculo esquelético, riñón e hígado (Sugiura *et al.*, 2002).

3.5. Funciones de los esfingolípidos en plantas

En contraste con los estudios realizados en células animales y levaduras, se conoce poco sobre las funciones de los esfingolípidos en plantas, aunque desde hace algunos años ha surgido un gran interés en el campo enfocado a la biosíntesis y función de estas moléculas (Worral *et al.*, 2003). *Arabidopsis thaliana* es uno de los mejores organismos modelo para estudiar el metabolismo y las funciones de los esfingolípidos en plantas superiores ya que su genoma se encuentra totalmente secuenciado (Dunn *et al.*, 2004), hay una colección considerable de mutantes de inserción y la planta se puede transformar fácilmente para estudiar la sobreexpresión o inactivación de un gen.

Los estudios de la función de los esfingolípidos en plantas se han centrado en cinco aspectos que se presentan a continuación:

- a) *Señalización celular*: Se ha demostrado que la esfingosina-1-fosfato es un componente de la señalización mediada por el ácido abscísico (ABA) en las células guardia durante estrés por sequía. Este lípido promueve el cierre de las células guardia mediado por Ca^{2+} y se ha demostrado que la insaturación es indispensable para llevar a cabo esta actividad (Ng *et al.*, 2002)

Recientemente se comenzaron a estudiar los detalles de su mecanismo de acción en plantas. En la planta *Commelina communis*, se ha descubierto que So1P es un mensajero movilizador de Ca^{2+} en la señalización por ABA y por sequía en células guardia. En este caso, la sequía y la percepción de ABA conducen a un incremento de So1P, seguido por un aumento en la concentración de iones de calcio en el citosol de las células guardia, lo que conduce finalmente a una reducción en la apertura del poro estomatal. La So1P modula el turgor de las células guardia afectando las actividades de los canales de K^+ y los canales aniónicos lentos, regulados por cambios en $[Ca^{2+}]_{ca}$. Se ha demostrado que el efecto de ABA en las actividades de estos dos tipos de canales disminuye con la *N,N*-dimetil esfingosina (DMS), un inhibidor de la esfingosina cinasa (Hetherington, 2001).

En protoplastos de células guardia de *A. thaliana*, la actividad de la esfingosina cinasa (SK), que sintetiza a la So1P, está modulada por ABA, que induce la producción de So1P en tiempos muy breves (2 min), manteniéndose los niveles por un período de 15 min y regresando a su nivel basal después de 30 min, lo que indica que estas células tienen la maquinaria completa para la producción y degradación de la So1P. Esta vía de señalización está involucrada tanto en la inhibición de la apertura de estomas, como en la promoción

del cierre estomatal causados por ABA (Coursol *et al.*, 2003). En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado cuatro secuencias que codifican esfingosina cinasas putativas (At4g21540, At5g58490, At2g46090 y At5g23450), una fosfohidrolasa de So1P (At1g27980) y una liasa de So1P (At3g58490). Aún no se han caracterizado bioquímicamente estas cinasas, fosfohidrolasa y liasa, ni se sabe si ABA puede modificar la actividad de la fosfohidrolasa y liasa putativas (Worrall *et al.*, 2003; Coursol *et al.*, 2003).

En células animales la So1P se une a un receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas y en plantas se demostró la participación de estas últimas en la señalización mediada por So1P a través de mutantes de *A. thaliana* que carecen de la subunidad alfa de la proteína G. En estas mutantes no se observa ni la regulación de la apertura estomatal, ni la activación de canales iónicos como en las plantas silvestres en respuesta a So1P (Coursol *et al.*, 2003). Sin embargo, aunque estos datos muestran que $G\alpha$ es importante en la señalización por So1P, la ausencia de un receptor GPCR tipo So1P sugiere que la So1P podría operar a través de una nueva clase de receptores en plantas (Worrall *et al.*, 2003; Coursol *et al.*, 2003).

- b) *Estabilidad membranar*: En diversos sistemas se ha demostrado que las glucosilceramidas y esfingolípidos relacionados incrementan la estabilidad y disminuyen la permeabilidad de las membranas como consecuencia de la formación de puentes de hidrógeno intra- e intermoleculares entre los grupos amida e hidroxilo de la ceramida. Los esfingolípidos han sido implicados en la regulación de la permeabilidad a iones; la membrana plasmática y el tonoplasto están enriquecidas en estos lípidos, ya que desempeñan funciones críticas de permeabilidad (Lynch, 1993). Los esfingolípidos vegetales se asocian con esteroides (sitosterol y stigmasterol principalmente) para formar balsas de lípidos. Se ha demostrado en membranas modelo, que pequeñas cantidades de ceramida libre estabilizan la formación de los dominios, sugiriendo que esta molécula está involucrada en la señalización para que se concentren los lípidos y esteroides (Sperling y Heinz, 2003; Xu *et al.*, 2001).
- c) *Respuesta al estrés abiótico*: En animales y plantas, los tejidos expuestos a estrés químico presentan esfingolípidos con mayores niveles de hidroxilación, lo cual es consistente con su función de estabilización de la membrana. Asimismo, se ha sugerido que las

glucosilceramidas podrían estar asociadas con la sensibilidad al congelamiento y adaptación al frío. Además de las funciones estructurales como componentes de las membranas, los esfingolípidos desempeñan un papel en el reconocimiento celular y en la transducción de señales (Lynch, 1993; Sperling y Heinz, 2003).

- d) *Fitopatogénesis*: Un campo reciente en el estudio de las funciones de los esfingolípidos comprende las interacciones planta-patógeno. Algunos cerebrósidos fúngicos – como los cerebrósidos A y C, aislados del hongo patógeno de arroz *Magnaporthe grisea* – funcionan como elicitores causando respuesta de hipersensibilidad, acumulación de fitoalexinas y resistencia incrementada a infecciones subsecuentes por patógenos compatibles. Se tiene evidencia de que la glucosa en esta molécula no es esencial para despertar la respuesta, porque la ceramida también tiene actividad elicitora, aunque con una menor eficiencia (Koga *et al.*, 1998; Umemura *et al.*, 2000). En este modelo, también hay evidencias de la participación de proteínas G en la señalización por esfingolípidos durante la defensa, pues las plantas de arroz que carecen del gen que codifica la subunidad α del heterotrímero presentan niveles menores de especies reactivas de oxígeno (EROS) y de transcritos de genes relacionados con la patogénesis (PR). Por parte del patógeno, los esfingolípidos, además de funcionar como moléculas elicitoras pueden regular el desarrollo.

Asimismo, se ha observado que la expresión del gen de la enzima serina palmitoiltransferasa aumenta durante la respuesta de hipersensibilidad en variedades resistentes de papa infectadas con el hongo *Phytophthora infestans*, hecho que apunta a una asociación posible entre la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos y la respuesta de defensa (Birch *et al.*, 1999; da Silva *et al.*, 2004).

Además de la biosíntesis, también se ha encontrado una asociación con el transporte intracelular de esfingolípidos y la respuesta de defensa. Una mutante de *Arabidopsis*, llamada *acd11* (accelerated cell death-11) tiene una delección en el gen *ACD11*, que es homólogo a la proteína de transferencia de glicolípidos de mamíferos, pero que tiene una alta afinidad por esfingosina para su transferencia entre membranas *in vitro*. Esta mutante expresa de manera constitutiva los genes relacionados con la defensa que acompañan a la respuesta de hipersensibilidad desatada por los patógenos avirulentos, lo que indica un papel esencial en el transporte de esfingolípidos en la regulación de los mecanismos de defensa de las plantas (Brodersen *et al.*, 2002).

En el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, que causa antracnosis en distintas plantas, las glucosilceramidas son indispensables para la diferenciación de las conidias a células miceliales, por lo que la inhibición de su síntesis puede ser clave en algunas interacciones planta-patógeno (Da Silva *et al.*, 2004).

Ferket y colaboradores (2003) demostraron que las cepas de *Neurospora crassa* resistentes a la permeabilización de la membrana causada por defensinas vegetales contienen un perfil diferente de glucosilceramidas y glucosilinositolfosforilceramidas que las cepas sensibles.

Todas estas evidencias sugieren que los esfingolípidos regulan la diferenciación y respuesta tanto en las células del patógeno como en la planta hospedera y que podrían ser reguladores fundamentales en la interacción entre ellos.

- e) *Muerte celular programada*: Las evidencias recientes sugieren que la muerte celular programada inducida por algunas micotoxinas resulta de alteraciones en el metabolismo de esfingolípidos pues se acumulan bases esfingoideas libres. Esta muerte celular programada se puede revertir con la adición de ceramida, lo que sugiere que los niveles de ceramida y bases esfingoideas actúan como un mecanismo que determina la muerte o supervivencia (Worral *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis* se ha caracterizado una mutante en la ceramida cinasa (accelerated cell death 5, ACD5), que acumula los sustratos de la ceramida cinasa y presenta síntomas incrementados de enfermedad durante ataque por patógenos y muerte celular tipo apoptosis dependiente de la señalización de defensa en su desarrollo tardío. La proteína ACD5 tiene alta especificidad por ceramidas *in vitro*. La ceramida C2 induce la muerte celular programada mientras que su derivado fosforilado la bloquea, apoyando el papel de la fosforilación de ceramida en la modulación de la muerte celular en plantas (Liang *et al.*, 2003).

3.6. Herramientas para el estudio de los esfingolípidos

Para el estudio del metabolismo y función de esfingolípidos en los diversos sistemas, se han empleado varias herramientas que modifican los niveles de estos lípidos en las células. Los estudios de los niveles de esfingolípidos requieren métodos sensibles y confiables. Los más utilizados para detectar los niveles de esfingolípidos utilizan sustratos marcados radiactivamente (Min *et al.*, 2002).

La So1P se puede cuantificar por modificación química a ^3H -ceramida1-P, por desfosforilación de la esfingosina seguida por refosforilación en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, o por HPLC con derivatización precolumna con α -ftaldialdehído. Este método tiene la ventaja de que permite cuantificar varias bases esfingoideas y sus derivados fosforilados (Min *et al.*, 2002).

3.6.1. Fumonisinina B1

Las fumonisinas (FB₁-FB₄) son micotoxinas producidas por el hongo fitopatógeno *Fusarium verticillioides*, contaminante del maíz, sorgo y otros cereales. Su producción depende de las condiciones ambientales, del transporte y del almacenamiento de los granos. Estas toxinas fueron aisladas y caracterizadas por primera vez en 1988 por un grupo de investigadores sudafricanos y su estructura química reveló que son compuestos similares a esfingolípidos. El esqueleto de la fumonisina es una cadena hidroxilada de 20 carbonos con dos grupos laterales propano-1,2,3-tricarboxílicos (ácido tricarbálico). Las diversas fumonisinas se diferencian entre sí por los sustituyentes de sus grupos hidroxilo o del ácido tricarbálico (Fig. 8). Distintas cepas de *Fusarium* producen cantidades variables de cada fumonisina o combinaciones de éstas (Abelson *et al.*, 2000; Nelson, 1993; Gamanya y Sibanda, 2001).

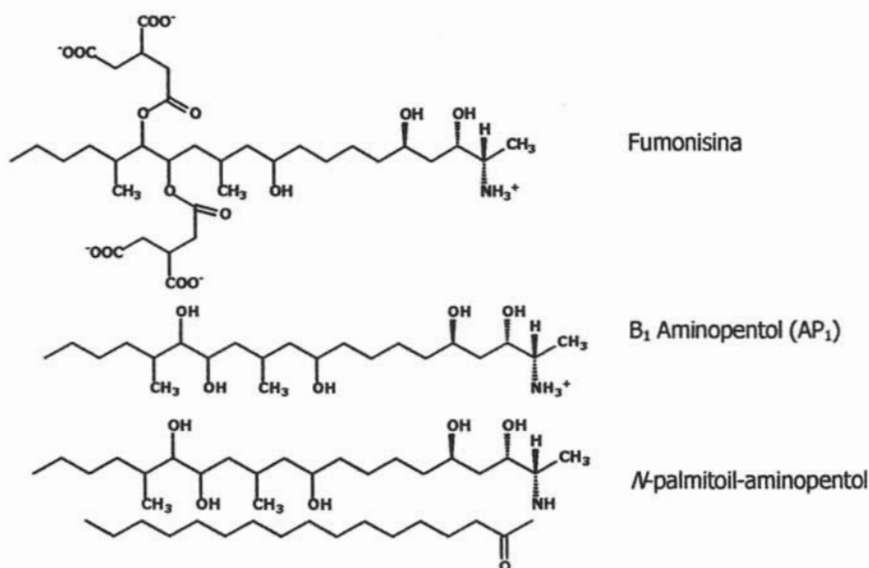


Figura 8. Estructura de las Fumonisin, aminopentol y palmitoilaminopentol (Desai *et al.*, 2002).

Los cuatro grupos carboxilo y el grupo amino hacen que la FB₁ sea soluble en agua, mientras que FB₂, FB₃ y FB₄ requieren la adición de un disolvente polar para afectar su solubilidad. Las fumonisinas son insolubles en disolventes orgánicos no polares. En disolventes polares, la FB₁ existe como un zwitterion y puede interactuar con metales.

Debido a la similitud estructural de la fumonisina con las bases esfingoideas (ver figuras 4 y 8), ésta es un potente inhibidor de la enzima esfinganina-*N*-aciltransferasa. Al inhibir a la enzima, se genera un incremento en la concentración de bases esfingoideas libres y una disminución en la producción de esfingolípidos complejos (Merrill *et al.*, 1997; Abbas *et al.*, 1994; Shier, 1992).

Aparentemente, la FB₁ interactúa con los sitios de unión tanto de la esfinganina como del acil-CoA de la enzima, ya que su potencia inhibitoria está determinada por la concentración de ambos sustratos. La IC₅₀ para la FB₁ en hepatocitos de rata es 0.1 μM. El modelo actual para el mecanismo de inhibición de la esfinganina-*N*-aciltransferasa establece que el esqueleto aminopentol compite por el sitio de unión de la base esfingoidea, mientras que los ácidos tricarbálicos interfieren con la unión del ácido graso-CoA (Desai *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1991). Al remover las cadenas laterales de ácido tricarbálico, la inhibición disminuye alrededor

de 10 veces en ensayos *in vitro*. La FB1 no es acilada por la esfinganina-*N*-aciltransferasa, pero al remover los ácidos tricarbálicos (para producir aminopentol, AP₁) el inhibidor se convierte en un sustrato. El producto de esta reacción es el *N*-palmitoil-AP₁ (PAP₁) (ver figura 8), que es un inhibidor de la esfinganina-*N*-aciltransferasa *in vitro* aun más potente que la FB1, ya que causa un incremento mayor que la FB1 en los niveles de esfinganina de células HT-29 a concentraciones similares (Merrill *et al.*, 2001). Las diferencias estructurales entre las fumonisinas y la esfinganina incluyen la ausencia de un grupo hidroxilo en posición-1, la presencia de un grupo hidroxilo adicional en la posición-5 y una estereoquímica *trans* en las posiciones 2 y 3. Se han investigado las contribuciones de estas características sintetizando análogos de esfinganina sin el oxígeno en posición-1 e hidroxilados en posición-5. Los resultados indican que estos análogos son acilados, que incluso son mejores sustratos que la esfingosina y que también inhiben a la esfinganina-*N*-aciltransferasa (Desai *et al.*, 2002).

La inhibición de la esfinganina-*N*-aciltransferasa se puede revertir por dilución del inhibidor, es decir, la remoción de la FB1 del medio (experimentos *in vitro*) o el retiro de la FB1 de la dieta de los animales (experimentos *in vivo*). Debido a que la FB1 inhibe a la esfinganina-*N*-aciltransferasa a través de interacciones no covalentes, la reversibilidad se debe a la reducción de la concentración de FB1 en el citoplasma. Otros factores que afectan la reversibilidad son las concentraciones celulares de los sustratos de la enzima y la velocidad de eliminación de la esfinganina y esfingosina acumuladas (Merrill *et al.*, 2001; Huwiler *et al.*, 2000).

Como resultado de la inhibición de la esfinganina-*N*-aciltransferasa, no únicamente se acumula esfinganina, sino que cambian los niveles de otros lípidos que tienen importantes funciones en la célula:

- a) *Disminución de los niveles de ceramida y esfingolípidos complejos derivados de ésta:* Los cambios en la cantidad de esfingolípidos pueden alterar las funciones celulares que dependen de los esfingolípidos complejos, mientras que la acumulación de bases esfingoideas también perturba la estructura membranal (Merrill *et al.*, 2001).
- b) *Acumulación de bases esfingoideas fosforiladas y otros metabolitos:* Las bases esfingoideas se catabolizan por fosforilación y ruptura lítica a aldehídos grasos y fosfatos de etanolamina. La FB1 incrementa la cantidad de bases fosforiladas y aumenta la proporción de etanolamina fosfato incorporada en fosfatidiletanolamina. Asimismo, se incrementa la fitoesfingosina por la hidroxilación de la esfingosina (Merrill *et al.*, 2001).

- c) *Alteración de otras vías metabólicas de lípidos:* La fosfatasa del ácido fosfatídico es una de las enzimas sensibles a la concentración de bases esfingoideas libres. La FB1 altera ésta y otras enzimas en levadura. Esta enzima es un componente clave en la señalización por la vía de fosfolipasa D, ácido fosfatídico y DAG. Las bases esfingoideas y sus derivados fosforilados pueden activar también a la fosfolipasa D. Además, una enzima de la síntesis de DAG se inhibe por las bases esfingoideas. El metabolismo de colesterol también se afecta por la alteración del metabolismo de esfingolípidos dada la correlación entre ambas vías (Merrill *et al.*, 2001).
- d) *Formación de N-acetil derivados:* La acumulación de bases esfingoideas conduce a su metabolismo por la N-acetiltransferasa, que participa en el metabolismo de xenobióticos o por una transacetilasa que transfiere grupos acetilo de un factor activador de plaquetas hacia la esfingosina, por lo que se incrementan los niveles de compuestos como ceramidas de cadena corta. Se ha propuesto que las ceramidas C-2 se pueden utilizar como biomarcadores para la exposición a largo plazo a la FB1 (Merrill *et al.*, 2001).

Se ha asociado la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos por fumonisinas con la detención del ciclo celular, cambios morfológicos y un incremento en la muerte celular en líneas provenientes de riñón (Merrill *et al.*, 1997). En células CV-1, la FB1 tiene efecto en las proteínas que regulan el ciclo celular, ya que el tratamiento con la toxina conduce a la desfosforilación de la proteína de retinoblastoma (Rb), la represión de la actividad de la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) y la disminución de los niveles de ciclina E, además de que la toxina produce la elevación de la concentración de dos inhibidores de CDKs, Kip1 y Kip2 (Ciacci-Zanella *et al.*, 1998). La FB1 puede inducir apoptosis *in vitro* e *in vivo* en diversos sistemas y es antiproliferativa en varias líneas celulares humanas. Tanto la acumulación de esfinganina como la depleción de esfingolípidos complejos pueden ser responsables de la apoptosis inducida por la FB1, ya que altas dosis de bases esfingoideas, así como también inhibidores de la biosíntesis de esfingolípidos causan apoptosis (Merrill *et al.*, 1997).

Gopee y Sharma demostraron que el tratamiento con FB1 activa a PKC α , probablemente por la acumulación de esfinganina-1-fosfato, mientras que otras isoformas de PKC fueron reprimidas a largo plazo aparentemente por la acumulación de esfinganina o esfingosina, por lo que concluyen que los efectos de la FB1 observados sobre PKC se deben, al menos en parte, a la alteración del metabolismo de esfingolípidos (Gopee y Sharma., 2003).

La micotoxina es capaz de estimular la actividad de cPLA₂, incrementando la liberación de ácido araquidónico por una vía independiente de PKC, pero dependiente de MAPK y del incremento en los niveles de esfinganina (Pinelli *et al.*, 1999).

En fibroblastos Swiss 3T3, la fumonisina es capaz de inducir la mitogénesis y activar una cascada de MAP cinasas. Existe la posibilidad de que la FB1 se pueda unir directamente a los blancos de la esfingosina y esfinganina modulando las vías de transducción de señales reguladas por estos esfingolípidos, aunque el mecanismo de acción no se ha investigado con profundidad (Wattenberg *et al.*, 1996)

La FB1 también altera la unión de las proteínas ancladas a glicosil-fosfatidil inositol en las membranas. La pérdida de los esfingolípidos complejos juega un papel en el comportamiento anormal y la morfología alterada de las células tratadas con FB1 (Merrill *et al.*, 1997).

La perturbación en el metabolismo de esfingolípidos puede conducir a desbalances en el metabolismo de fosfoglicerolípidos, ya que ambas vías están reguladas coordinadamente (Merrill *et al.*, 1997).

En contraste, otros efectos de la FB1 no se han podido asociar con la acumulación de bases esfingoideas. La expresión del gen del factor α de necrosis tumoral en células de riñón porcino se incrementa en una forma dependiente de dosis de FB1, pero ni la esfinganina ni la esfingosina afectan la expresión de TNF α (He *et al.*, 2001).

La FB1 (70 μ M) causa una elevación en los niveles de bases esfingoideas en arroz, callos de tabaco, lenteja de agua y discos de hoja de jitomate; también se ha reportado que la FB1 inhibe la síntesis de ceramida en preparaciones microsomales de calabaza (Abbas *et al.*, 1994). En estos sistemas, la elevación en los niveles de bases esfingoideas libres es evidente antes de la aparición de signos de pérdida de electrolitos, lo que es consistente con el hecho de que la alteración del metabolismo de esfingolípidos es una lesión bioquímica temprana (Abbas *et al.*, 1994).

La fumonisina induce una respuesta de tipo HR y muerte celular en *Arabidopsis* a través de vías de señalización que requieren ácido salicílico, jasmonato o etileno pues mutantes en alguno de estos componentes que alteran la ruta presentan una mayor resistencia a los efectos de la toxina (Asai *et al.*, 2000).

La acumulación de bases esfingoideas causada por la FB1, podría llevar a la alteración de la regulación celular y a citotoxicidad (Abbas *et al.*, 1994). En plantas, la adición de bases

esfingoideas (fitoesfingosina, esfinganina y esfingosina) al medio causa síntomas de fitotoxicidad en la lenteja de agua (*Lemna pausicostata*) similares a los ocasionados por las fumonisinas, lo que apoya que el mecanismo por el cual las fumonisinas causan toxicidad en plantas involucra la interrupción del metabolismo de esfingolípidos por la inhibición de la síntesis de ceramida (Abbas *et al.*, 1994). En plántulas de *Arabidopsis thaliana*, la FB1 induce un proceso de muerte celular programada característico de la respuesta de hipersensibilidad, pues ocurre generación de especies reactivas de oxígeno, deposición de callosa, acumulación de fitoalexinas y expresión de genes relacionados con la patogénesis (Stone *et al.*, 2000; Asai *et al.* 2000). Sin embargo, en estos trabajos no se estableció con claridad si la respuestas observadas están asociadas con la alteración del metabolismo de esfingolípidos, pues no se reporta cómo se modifican los niveles de estos compuestos.

3.6.2. Inhibidores de la SPT

También se han descubierto y caracterizado varios inhibidores naturales de la SPT. Algunos ejemplos son las esfingofunguinas, lipozamicina (neoenactina M₁) y miriocina (ISP-1/termozimocidina), que inhiben de manera potente y selectiva a la enzima, con valores de IC₅₀ en cultivos celulares en el orden de nanomolar (Hanada, 2003).

a) Miriocina

La miriocina (ISP-1 o termozimocidina) es un inmunosupresor de estructura análoga a la esfingosina. Es producido por el hongo entomopatógeno *Isaria (Cordyceps) sinclairii (Paecilomyces cicadae)*, que se utiliza en la medicina china tradicional y tiene aplicación potencial como pigmento natural (Miyake *et al.*, 1995; Osuchowski *et al.*, 2004).

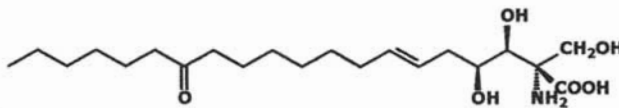


Figura 9. Estructura de la miriocina (Hanada *et al.*, 2000).

Este metabolito inhibe a los linfocitos T citotóxicos aloreactivos *in vivo*, con una potencia de 10 a 100 veces mayor que la ciclosporina A, pero no suprime la producción de IL-2 (Miyake *et al.*, 1995). Aunque la inhibición de la actividad de SPT en linfocitos (línea CTLL-2) se consideraba irreversible, Ikushiro y colaboradores (2004) demostraron que la reacción de unión de la L-serina a la SPT de *Sphingomonas* se inhibe competitivamente con miriocina. La afinidad del inhibidor es 10^3 veces mayor que la de la L-serina gracias a la larga cadena hidrofóbica del inhibidor, que interactúa aparentemente con el sitio de unión del palmitoil-CoA. En regiones localizadas de cerebros de ratones tratados con miriocina, se detectaron cambios en los niveles de dopamina, norepinefrina y serotonina. Sin embargo, en este tejido la actividad de SPT y los niveles de esfinganina (Sa) y esfingosina (So) permanecieron sin alteraciones, mientras que la actividad de SPT y el nivel de Sa disminuyeron en el hígado, lo que implica distintos grados de susceptibilidad de la SPT dependientes del tejido (Osuchowski *et al.*, 2004).

b) β -cloroalanina

En contraste, la β -cloroalanina y otros aminoácidos α o β -halogenados sintéticos inhiben de manera irreversible a la SPT, uniéndose al piridoxal fosfato de la enzima, para formar el intermediario aldimina (Figura 10). La Lys265 de la SPT sustrae el protón α de la β CA y el cloruro se elimina para formar la aldimina aminoacrilato-PLP. El aminoacrilato se libera y se regenera la aldimina interna por transaldiminación. Posteriormente existen dos vías. Una es la regeneración de la enzima activa por la disociación del aminoacrilato, que se hidroliza a piruvato y amonio en solución acuosa. La otra vía es la inactivación irreversible vía ataque nucleofílico del aminoacrilato en la aldimina interna. Debido a que existen dos rutas, solamente una molécula de SPT en cada 300 ciclos catalíticos es inactivada (Ikushiro *et al.*, 2004).

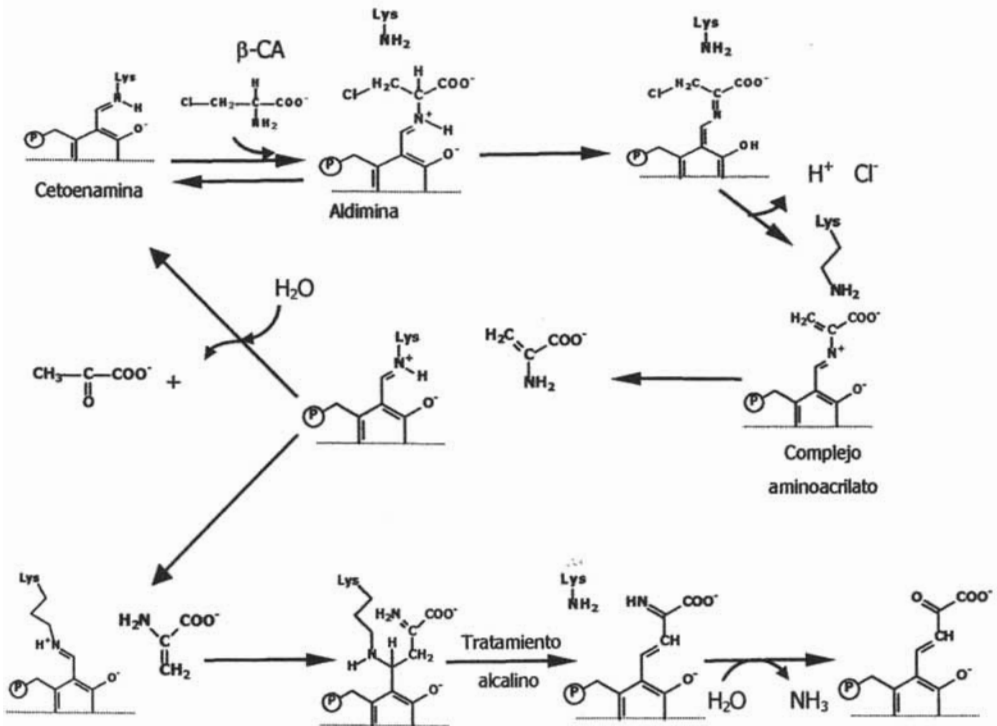


Figura 10. Mecanismo de inhibición de la SPT por la β -Cl-alanina (Ikushiro *et al.*, 2004).

En células ováricas de hámster chino (CHO), la β -Cl-alanina causa la inactivación completa e irreversible de la enzima, de manera dependiente del tiempo y la concentración. En estas células, los efectos del inhibidor produjeron poca o nula perturbación en otras funciones celulares. Aunque la β -Cl-alanina inhibe otras enzimas dependientes de piridoxalfofato, las transaminasas de alanina y aspartato no se inhibieron bajo las condiciones del ensayo (Medlock y Merrill, 1988; Hanada *et al.*, 2000).

En algunos sistemas, la inhibición de la serina-palmitoil-transferasa, bloquea la formación de esfinganina en el primer paso del metabolismo de esfingolípidos y revierte, al menos temporalmente, el efecto de las fumonisinas (Merrill *et al.*, 2001), lo que ha permitido establecer si la acumulación de bases esfingoideas media los efectos observados con la FB1.

4. MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS

4.1. Introducción

Las plantas deben defenderse constantemente contra el ataque de bacterias, virus, hongos, invertebrados e incluso de otras plantas. Debido a que su inmovilidad les impide escapar, cada célula vegetal posee capacidad de defensa tanto constitutiva como inducida. Esta estrategia de defensa minimiza las infecciones y sus efectos. En poblaciones de plantas silvestres, la mayoría de las plantas se mantienen libres de infecciones gran parte del tiempo y si ocurren infecciones, generalmente se restringen a algunos individuos y se afecta únicamente una porción pequeña de tejido. La *enfermedad* es el resultado de una infección exitosa y rara vez las plantas mueren (Hammond-Kosack y Jones, 2000). Entre las plantas y los patógenos ha evolucionado una compleja red de interacciones que refleja tanto las estrategias de adquisición de nutrientes de los patógenos como los mecanismos de defensa de la planta (Veronese *et al.*, 2003).

4.2. Mecanismos de defensa de las plantas

4.2.1. Respuesta de hipersensibilidad

Cada célula vegetal necesita un sofisticado sistema de vigilancia para activar sus respuestas de defensa rápidamente en el sitio de la invasión por el patógeno. Este sistema debe ser completamente funcional en plantas sanas y debe ser capaz de distinguir entre las señales generadas por la planta y aquellas emitidas por los patógenos. Mas aun, cuando las señales no propias son detectadas, el sistema de la planta debe discriminar entre patógenos dañinos y organismos benéficos, tales como *Rhizobium* o micorrizas (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

El reconocimiento de un patógeno genéticamente incompatible resulta en la activación de una serie compleja de respuestas de defensa. El proceso se coordina temporal y espacialmente para asegurar que un número acotado de células sean reclutadas para la defensa. Esta inducción de la defensa de la planta es rápida y muy localizada y tiene como resultado la creación de condiciones desfavorables para el crecimiento y reproducción del patógeno. Al mismo tiempo, las células vegetales impiden la diseminación de enzimas y toxinas dañinas provenientes del patógeno. La activación completa de la respuesta contra el patógeno

ocurre dentro de las primeras 24 horas posteriores a la infección y conduce invariablemente a la muerte celular localizada. La rápida activación de las reacciones de defensa, en asociación con la muerte celular del hospedero se denomina *respuesta de hipersensibilidad (HR)* (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

La muerte celular causada por la respuesta de hipersensibilidad puede ser necrosis o muerte celular programada, que tienen diferencias tanto morfológicas como bioquímicas. La necrosis se considera generalmente como el resultado de daño severo a los tejidos y se puede iniciar por la formación de hidroperóxidos lipídicos tóxicos. La HR necrótica está relacionada con la peroxidación de lípidos, siendo la causa posible del daño membranal y la muerte celular. En contraste, la muerte celular programada utiliza un mecanismo de suicidio celular conocido como apoptosis en animales. Está caracterizada por la formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación de DNA en tamaños definidos. Existen varias vías posibles que regulan la muerte celular programada y que están relacionadas con las especies reactivas de oxígeno, del óxido nítrico (NO), ácido salicílico (SA), jasmonato (JA), etileno y algunas proteínas (Figura 11) (Gozzo, 2003).

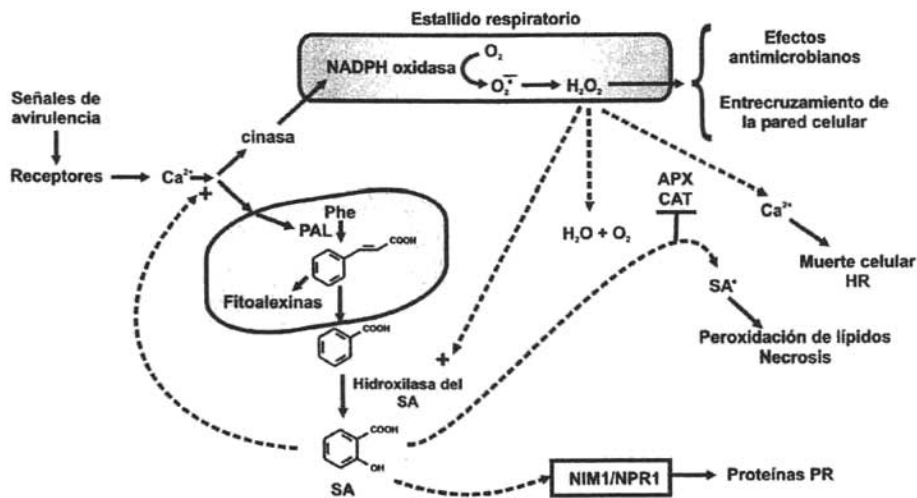


Figura 11. Redes de señalización de la HR. Abreviaturas: APX, ascorbato peroxidasa; CAT, catalasa; CHS, chalcona sintasa; NIM1=NPR1, proteína mediadora de la transducción de señales para la expresión de los genes relacionados con la patogénesis (PR); PAL, fenilalanina amonio lisasa; Phe, fenilalanina; HR, respuesta de hipersensibilidad; SA, ácido salicílico (Gozzo, 2003).

4.2.2. **Compuestos que intervienen en la respuesta de defensa de la planta**

- a) **Defensas preformadas:** La mayoría de las plantas sanas poseen diversos metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas. Estos compuestos pueden estar presentes en su forma activa o ser almacenados como precursores que se convierten a su forma activa por las enzimas del hospedero en respuesta al ataque de patógenos o al daño tisular. En general, los inhibidores preformados están secuestrados en vacuolas u organelos en las capas celulares externas de los tejidos vegetales (Hammond-Kosack y Jones, 2000). La importancia de estas defensas preformadas se infiere de la observación de que plantas resistentes se pueden convertir en susceptibles por deficiencias en la producción de estos metabolitos secundarios o por la habilidad del patógeno para degradarlos (Veronese *et al.*, 2003)

Dos clases de inhibidores preformados son las *saponinas* y los *glucosinatos*. Las saponinas son compuestos glicosilados, clasificados como triterpenoides, esteroides o glicoalcaloides esteroidales y se expresan de manera constitutiva en plantas sanas. Los glucosinatos son glicósidos que contienen azufre producidos por los miembros de la familia Brassicaceae, incluyendo a *Arabidopsis thaliana*. Estos compuestos se activan únicamente en respuesta a daño tisular por la actividad de la enzima mirosinasa, una tioglucosidasa (Hammond-Kosack y Jones, 2000; Toyoda *et al.*, 2002).

- b) **Especies reactivas de oxígeno:** En muchas reacciones incompatibles, es decir, en las que la planta reconoce al patógeno y establece una respuesta de defensa, la primera respuesta detectada es la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), que ocurre dentro de los primeros cinco minutos posteriores a la infección. La activación del estallido respiratorio es dependiente de cambios rápidos en flujos iónicos, principalmente de calcio. Existen cinasas dependientes de calcio (CPKs) implicadas en la regulación de la producción de especies reactivas de oxígeno y otras respuestas de defensa. Las EROS detectadas más comúnmente son el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y el oxígeno en singulete. Las plantas producen anión superóxido a partir de oxígeno molecular utilizando una *NADPH oxidasa*, que está asociada a la membrana.

Existe evidencia que sugiere un papel de las EROS como moléculas señalizadoras que amplifican la señal y activan otras vías. El H_2O_2 induce a la enzima 2-hidroxilasa del ácido benzoico, requerida para la biosíntesis de ácido salicílico. El peróxido de hidrógeno también induce genes de proteínas involucradas en diversos mecanismos de protección celular, por

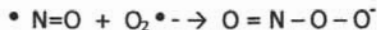
ejemplo, la glutatión-S-transferasa. La producción de EROS es capaz de alterar el balance redox en las células, lo que puede modificar la función de algunos factores de transcripción que se regulan por oxidación-reducción (Hammond-Kosack y Jones, editores, 2000).

Las EROS pueden promover la síntesis de intermediarios de señalización, tales como ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico. Pueden inducir muerte celular como resultado de la respuesta de hipersensibilidad; inducen la síntesis de químicos antimicrobianos, alteran la pared celular y activan genes de defensa que codifican potentes proteínas antimicrobianas (Veronese *et al.*, 2003).

- c) **Óxido nítrico (NO):** Es una molécula señalizadora cuyo papel en mamíferos es el de regular varios procesos biológicos de los sistemas inmune, nervioso y vascular. Recientemente, ha sido reconocido como una importante molécula señalizadora en la respuesta de hipersensibilidad en plantas y se sabe que actúa en cooperación con las especies reactivas de oxígeno. El NO es un radical libre que puede evitar los efectos nocivos del radical hidroxilo por la siguiente reacción:



o reaccionar con el anión superóxido para producir el peroxinitrito, que es muy reactivo:



En plantas, el peroxinitrito no parece ser esencial para la muerte celular programada mediada por NO. Aparentemente, la respuesta de hipersensibilidad es dependiente de un balance adecuado entre las concentraciones de NO y H₂O₂ (Gozzo, 2003).

4.2.3. Respuestas de defensa de las plantas, dependientes e independientes de ácido salicílico (SA).

La percepción de un patógeno por la planta inicia una respuesta de defensa rápida por medio de una diversidad de vías de transducción de señales. El principal blanco de estas vías de transducción es el núcleo, donde las señales conducen a la activación transcripcional de un gran número de genes y como consecuencia a la síntesis *de novo* de una variedad de proteínas y compuestos antimicrobianos. La respuesta de la planta está asociada con una dramática reprogramación del metabolismo celular. Rápidamente se induce la expresión de gran número de genes involucrados en vías metabólicas primarias y secundarias. La expresión de los genes de respuesta a patógenos está regulada temporal y espacialmente. Algunos

genes se activan de manera rápida y localizada en el sitio de la infección, mientras que otros se activan de manera más lenta, ya sea a nivel local o sistémico. Se han identificado varias hormonas vegetales que regulan estas respuestas; el ácido salicílico por un lado induce la expresión de ciertos genes mientras que el etileno y el ácido jasmónico promueven la expresión de otros. Esta distinción ha permitido clasificar las respuestas dependientes e independientes de ácido salicílico (Rushton y Somssich, 1998).

a) **Respuestas de defensa dependientes de ácido salicílico:** Se ha sugerido que la principal vía de producción de SA asociada con la defensa en *Arabidopsis* involucra a la enzima isocorismato sintasa localizada en cloroplasto, codificada por el gen *ICS1/EDS16/SID2*. Su sustrato es el corismato, producido por la vía del shikimato. El transporte de SA desde los plastidios al citoplasma podría ser facilitado por una proteína transmembranal localizada en cloroplasto, codificada por *EDS5/SID* (Nimchuk *et al.*, 2003). En *Arabidopsis*, la activación de los genes PR por SA, así como la HR inducida por patógenos son dependientes de la señalización por fitocromo y las condiciones lumínicas. Se han identificado varios blancos directos del SA, por medio de ensayos de unión. Se demostró que se requiere la presencia de una anhidrasa carbónica localizada en cloroplasto para la función de los genes de resistencia (genes R) en tabaco. Esta enzima tiene actividad antioxidante y puede afectar la señalización de defensa controlando los niveles de EROS producidos durante el estallido respiratorio (Nimchuk *et al.*, 2003).

Además de la inducción de los genes PR, se sabe que el SA actúa antes de la divergencia de dos ramas metabólicas que conducen a la vía de fenilpropanoides y a la activación del estallido respiratorio, respectivamente. De esta manera, el SA amplifica su propia síntesis, que es además estimulada por H_2O_2 (Gozzo, 2003).

b) **Respuestas de defensa independientes de ácido salicílico:** Las plantas con deficiencias en la respuesta de defensa dependiente de ácido salicílico no muestran mayor susceptibilidad al hongo *Botrytis cinerea*, lo que indica que el SA no es esencial para la defensa contra todos los patógenos. Por otro lado, plantas que tienen defectos en la vía de señalización por jasmonato (JA) o etileno presentan una mayor susceptibilidad hacia este hongo, indicando que estas dos hormonas participan en la defensa de la planta. El JA es una hormona derivada del ácido linolénico y es similar a la hormona oxilipina encontrada en animales. El JA y su derivado éster metilado (metil jasmonato) están involucrados en

respuestas de las plantas al daño tisular y en la defensa contra los insectos. Aunque el mecanismo de biosíntesis de JA se conoce totalmente, la percepción y subsiguiente transducción de señales aún no se han detallado. El etileno regula muchos procesos de crecimiento y desarrollo vegetal y también participa en la señalización por heridas, infecciones o tratamiento con elicitores, en las que su producción está asociada con la de JA. Aparentemente, las vías de transducción de señales de ambas hormonas interactúan entre sí para coordinar la expresión de un grupo de genes PR en *Arabidopsis*, que comprenden a los genes *PR-3*, *PR-4* y *PR-12*, que codifican proteínas antimicrobianas. Para la expresión del gen *PR-12* se requiere la expresión de ambas hormonas. El JA y el etileno son capaces de estimular mutuamente su biosíntesis. Aunque el mecanismo de regulación de los genes *PR-3*, *PR-4* y *PR-12* aún no se conoce, se sabe que es distinto de la de los genes PR dependientes de SA, como *PR-1*, *PR-2* y *PR-5*, ya que no depende de NPR1/NIM1 (Thomma *et al.*, 2001; Gozzo, 2003).

- c) **Relación entre las vías dependiente e independiente de SA:** La evidencia sugiere que la respuesta de defensa dependiente de SA es efectiva contra patógenos biotróficos, como *P. parasitica*; la respuesta contra este tipo de patógenos se asocia con la respuesta de hipersensibilidad en la que la muerte localizada de células conduce a la privación de nutrientes para el patógeno. Por el contrario, la respuesta dependiente de JA y etileno es aparentemente más efectiva contra parásitos necrotrofos como *B. cinerea*. En los grupos de patógenos biotróficos y necrotrofos existen hongos y bacterias, por lo que es posible que el tipo de patogenicidad, más que la filogenia, sea el factor determinante de la efectividad del mecanismo de resistencia de la planta (Thomma *et al.*, 2001).

La existencia de múltiples mecanismos de defensa puede ser la respuesta de la evolución a las diferentes especies capaces de infectar a las plantas. Aunque la HR restringe el crecimiento de los organismos biotrofos, los organismos necrotrofos podrían infectar a la planta debido a la muerte celular causada por la HR dependiente de SA. Como consecuencia, las plantas pudieron haber generado la vía dependiente de etileno y JA, que funciona en contra de organismos necrotrofos (Thomma *et al.*, 2001).

A pesar del paralelismo aparente de ambas vías de señalización, existe evidencia que sugiere que podrían interactuar, ya que tanto el SA como el JA contribuyen a la resistencia de *Arabidopsis thaliana* contra el hongo *Plectosphaerella cucumerina*. Se sabe también que

la ruta biosintética de JA es afectada, en más de un paso metabólico, por el SA (Thomma *et al.*, 2001; Gozzo, 2003).

4.2.4. Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR)

Una característica común del sistema inmune innato de organismos tan diversos como mamíferos, insectos y plantas, es la habilidad de acumular proteínas y péptidos antimicrobianos en respuesta a una invasión por organismos extraños.

Las PR se han definido como proteínas codificadas por la planta hospedera, pero inducidas específicamente en situaciones patológicas, que no solamente se acumulan en el tejido infectado sino que son inducidas sistémicamente y se asocian con el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida en contra de otras infecciones por hongos, bacterias y virus (Van Loon y Van Strien, 1999).

Aunque se ha implicado a las PR en la respuesta de defensa, éstas no fueron identificadas por su actividad antimicrobiana, sino únicamente por su acumulación en plantas infectadas (Van Loon, 1997). Debido probablemente a la necesidad de que las PR funcionen en un ambiente hostil, la mayoría de éstas son resistentes a la temperatura, al pH y a la proteólisis (Muthukrishnan, 2001).

Se ha propuesto que estas proteínas participan en la adaptación al estrés biótico, ya que se ha demostrado que algunas de ellas tienen actividad de quitinasas y β -1,3-glucanasas, posiblemente con actividad antifúngica. También se sugiere que el conjunto de PR puede ser efectivo inhibiendo el crecimiento, multiplicación y diseminación del patógeno por lo que se pueden considerar proteínas de estrés producidas en respuesta a infecciones necrotizantes por virus, virioides, hongos y bacterias. En contraste con otras proteínas de estrés, las PR se acumulan en los tejidos vegetales en niveles que son fácilmente detectables por métodos de tinción tradicionales, alcanzando hasta un 1% de la proteína soluble total en hojas (Van Loon, 1997; Van Loon y Van Strien, 1999).

5. EL REFORZAMIENTO DE LA PARED CELULAR COMO MECANISMO DE DEFENSA Y LA GLICOPROTEÍNA RICA EN HIDROXIPROLINA

5.1 La pared celular

La pared celular representa la interfase dinámica entre las células vegetales y su medio ambiente, que incluye a las células vecinas (Showalter, 2001). Es una estructura altamente organizada que es capaz de autoensamblarse. Está compuesta de diversos polisacáridos, lignina y otras sustancias aromáticas, ceras, proteínas estructurales y enzimas, calcio, boro y agua. Algunas moléculas estructurales actúan como fibras y otras como una matriz que se entrecruza. La composición molecular y el arreglo de los polímeros de las paredes celulares difieren entre especies, tejidos de la misma especie, células individuales e incluso en regiones dentro de la misma célula (Cassab, 1998; Carpita y McCann, 2000).

La forma de las células vegetales está determinada en gran medida por su pared celular. En las células, la pared celular restringe la velocidad y dirección del crecimiento celular, ejerciendo una gran influencia en el desarrollo y morfología de la planta. Las paredes celulares también contribuyen a la especialización funcional de los distintos tipos celulares (Carpita y McCann, 2000).

La pared celular es un compartimiento dinámico cuya composición varía a través de la vida de la célula. Esta estructura se modifica continuamente por medio de acción enzimática durante el crecimiento, desarrollo, estrés ambiental e infección de las plantas. La *pared celular primaria* se genera durante la división celular y rápidamente incrementa su superficie durante la expansión de la célula. La lámina media forma la interfase entre la pared celular primaria de las células vecinas. Finalmente, cuando se diferencian, las células elaboran una pared celular secundaria, formada de estructuras complejas adaptadas para la función de la célula específica. La biosíntesis y diferenciación de las paredes celulares es un proceso altamente regulado, de manera temporal y espacial (Cassab, 1998; Carpita y McCann, 2000).

No todas las funciones especializadas de la pared celular son estructurales, pues en ciertos tipos celulares existen moléculas que afectan los patrones de desarrollo y marcan la posición de la célula dentro de la planta. Además, la pared contiene moléculas de señalización que participan en la comunicación célula-célula y pared celular-núcleo. Los fragmentos de polisacáridos provenientes de la pared celular pueden inducir la producción y secreción de

moléculas de defensa y la pared se puede impregnar de proteínas y lignina para defenderse contra la invasión de hongos y bacterias patógenos (Carpita y McCann, 2000).

5.2 Composición de la pared celular

5.2.1. Polisacáridos:

Son los principales componentes de las paredes celulares y forman su principal red estructural. Están formados por aproximadamente 11 monosacáridos diferentes. Existen distintos tipos de carbohidratos en las paredes celulares:

- *Celulosa*: Es el polisacárido vegetal más abundante, contribuyendo con el 15-30% del peso seco de la pared celular primaria y con un porcentaje mayor de las paredes celulares secundarias. Se encuentra en forma de microfibras, que son ensamblajes cristalinos de varias docenas de cadenas de (1→4)β-D-glucano que se unen para formar una microfibra de cientos de micrómetros de largo. Todas las fibras de celulosa están acomodadas de forma paralela, con sus extremos reductores apuntando en la misma dirección (Carpita y McCann, 2000).
- *Callosa*: son polímeros de (1→3)β-D-glucano, capaces de formar hélices dobles y triples. La callosa es secretada por pocos tipos celulares en etapas específicas del desarrollo de la pared celular. También se genera en respuesta a heridas y al intento de penetración de hifas de hongos patógenos (Carpita y McCann, 2000).
- *Glicanos*: Son polisacáridos que se unen por puentes de hidrógeno a las microfibras de celulosa, formando una compleja red. A los glicanos también se les llama *hemicelulosas*. Las dos clases principales de glicanos en la pared celular primaria de las plantas con flores son los xiloglicanos y los glucuronoarabinoxilanos.
- *Pectinas*: Son una mezcla de polisacáridos con ramificaciones heterogéneas, altamente hidratados, ricos en ácido D-galacturónico. Se pueden extraer de la pared celular utilizando quelantes de Ca²⁺. Se ha propuesto que determinan la porosidad de la pared celular y proporcionan superficies cargadas que modulan el pH de la pared celular y el balance iónico, también que regulan la adhesión célula-célula y que sirven como moléculas de reconocimiento que alertan a las células vegetales de la presencia de organismos simbióticos, patógenos e insectos. Existen enzimas de la pared celular que

se unen a la red de pectina, restringiendo su actividad a regiones localizadas de la pared. Al limitar la porosidad de la pared celular, las pectinas pueden afectar el crecimiento celular, regulando el acceso de las enzimas que degradan la pared celular hacia sus sustratos glicanos (Carpita y McCann, 2000).

5.2.2. Proteínas estructurales de la pared celular

Aunque la estructura principal de la pared celular está formada principalmente por carbohidratos, las proteínas estructurales también son capaces de formar redes en la pared celular. Las proteínas localizadas en esta estructura son ubicuas y son abundantes en las plantas y algas verdes. Mediante geles de proteínas de doble dimensión se ha determinado que existen varios cientos de proteínas en la pared celular. Generalmente, estas proteínas son ricas en uno o dos aminoácidos, contienen dominios de secuencias repetitivas y están glicosilados en diferente grado. Existen cuatro diferentes clases principales de proteínas estructurales en las paredes celulares, que presentan diferencias en abundancia dependiendo del tejido y tipo celular (Carpita y McCann, 2000; Showalter, 2001):

- a) *Proteínas con arabinogalactanas (AGPs)*: También se les ha llamado proteoglicanos, debido a que su contenido de carbohidratos excede el 95%. La unidad proteica es rica en Hyp, Ala, Thr, Gly y Ser, pero el contenido de aminoácidos varía dependiendo de las diferentes especies o tejidos. Se encuentran en la membrana celular, vesículas derivadas del aparato de Golgi, matriz extracelular, exudados gomosos de las plantas y pared celular. Aparentemente, son glicosiladas en el aparato de Golgi, ya que ese proceso involucra la unión de cadenas de galactanos largas y altamente ramificadas, con la adición subsecuente de unidades de arabinosa (Cassab, 1998; Carpita y McCann, 2000).

Las AGPs no se encuentran covalentemente unidas a la pared celular, por lo que no tienen funciones estructurales. Después de una herida, estas proteínas son secretadas en grandes cantidades y pueden actuar como una barrera física produciendo un tapón de gel. Sin embargo, las AGPs están presentes en muchos tejidos diferentes y no son producidas exclusivamente como respuesta a heridas. Se ha propuesto que tienen un papel importante en la diferenciación de las plantas. Estas proteínas son químicamente estables, resistentes a altas temperaturas y a tratamientos con álcalis y frío. Debido a su alto contenido de azúcares y a su consistencia cohesiva, se ha propuesto que las AGPs tienen funciones

importantes en la polinización, en procesos de reconocimiento de polen y adhesión al estigma y que sirven como nutrientes y adhesivos superficiales para el crecimiento del tubo polínico (Cassab, 1998).

- b) *Proteínas ricas en glicina (GRPs)*: Algunas de éstas contienen más de 70% de glicina y 12% de serina y presentan glicosilación. La estructura predicha para estas proteínas es de hoja β -plegada. Se cree que forman estructuras laminares en la interfase entre la membrana plasmática y la pared celular. La parte de la lámina que queda en contacto con la pared celular contiene aminoácidos aromáticos, pero su función es aún desconocida; es posible que jueguen un papel importante durante el desarrollo de tejidos vasculares, nódulos y flores y durante la reparación de heridas y la tolerancia al frío. Se piensa que se insolubilizan en la pared celular. Algunas GRPs tienen residuos de Tyr, que se pueden unir fácilmente a los residuos aromáticos de lignina. Estas proteínas son difíciles de extraer porque se entrecruzan con la pared celular (Carpita y McCann, 2000; Cassab, 1998).
- c) *Proteínas ricas en prolina (PRPs)*: Codificadas por una gran familia multigénica. Contienen esencialmente un motivo repetitivo: variaciones de (Pro-Hyp-Val-Tyr-Lys)_n. Su conformación es desconocida, pero existe similitud en la secuencia con proteínas que tienen forma de bastón (HRGPs). Aparentemente se insolubilizan de manera rápida en la matriz de la pared celular en respuesta a elicitores fúngicos y es posible que la insolubilización esté mediada por peróxido de hidrógeno, aunque el mecanismo preciso se desconoce. Estas proteínas se encuentran principalmente en el xilema, por lo que pueden estar involucradas en su diferenciación o lignificación. Las PRPs participan en diversos aspectos del desarrollo, tales como diferenciación de xilema y nódulos, así como en el desarrollo del ovario, embrión y microsporas, aunque sus funciones específicas en estos procesos son desconocidas (Carpita y McCann, 2000; Cassab, 1998).
- d) *Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina*: La mayoría de los genes y proteínas de HRGP caracterizados derivan de plantas dicotiledóneas, y unas pocas de monocotiledóneas, gimnospermas y algas verdes. En gran parte de las plantas estudiadas, estas proteínas son codificadas por familias multigénicas, que tienen un péptido señal para su exportación a la pared celular. En dicotiledóneas son llamadas extensinas y consisten en secuencias repetitivas de Ser(Hyp)₄ y Tyr-Lys-Tyr importantes para la estructura secundaria y terciaria. Además del motivo Ser(Hyp)₄, las HRGPs tienen otras secuencias repetidas, que varían

entre las distintas plantas. Todas las HRGPs tienen una gran abundancia de los aminoácidos Val, Tyr, Lys e His. Muchos de los residuos de Hyp están glicosilados con 1-4 residuos de arabinosa y algunos residuos de serina están glicosilados con una unidad de galactosa. (Cassab, 1998; Carpita y McCann, 2000; Yoshida *et al.*, 2001).

Muchos polímeros se modifican por esterificación, acetilación, arabinosilación para hacerlos solubles durante su transporte. Posteriormente, enzimas extracelulares eliminan estas modificaciones provocando su entrecruzamiento con la pared celular. Existe una gran variedad de posibilidades de entrecruzamiento, incluyendo puentes de hidrógeno, enlaces iónicos con Ca^{2+} , uniones covalentes tipo éster o éter e interacciones de van der Waals. Se ha sugerido que las proteínas con arabinogalactanas podrían funcionar como una matriz de chaperonas evitando las asociaciones prematuras y mantenga las funciones enzimáticas quiescentes hasta que los materiales secretados se hayan asociado en la pared. El proceso de ensamblaje ocurre en un ambiente acuoso ya que uno de los principales componentes de la pared celular es el agua. Este hecho tiene importancia estructural debido a que se requiere mantener a los polímeros en las conformaciones adecuadas. El agua es el medio que permite el paso de iones y moléculas de señalización a través del apoplasto, además de proveer un ambiente para que las enzimas funcionen (Carpita y McCann, 2000).

5.3 Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs)

5.3.1. Estructura

Son proteínas básicas con puntos isoeléctricos alrededor de 10. Las unidades repetidas de Hyp predicen una molécula tipo bastón de "poliprolina II" y se sabe que la arabinosa juega un papel importante en esta estructura, ya que cuando estos residuos se eliminan, se pierde la forma de bastón. Es posible que el acomodo de los arabinósidos determine la interacción de la HRGP con otros polímeros de la pared celular y por lo tanto que establezca el ensamblaje de la proteína en la estructura de la pared (Cassab, 1998; Yoshida *et al.*, 2001; Ferris *et al.*, 2001).

Las HRGPs se secretan hacia el apoplasto, donde se unen iónicamente a los polisacáridos ácidos. Su solubilidad disminuye durante el desarrollo celular o por estímulos externos (Otte y Barz, 2000). Se ha propuesto que las HRGPs se insolubilizan lentamente en la

pared celular por medio de enlaces covalentes. Uno de los enlaces sugeridos es un puente isoditrosina (difeniléster), formado entre dos residuos de Tyr de diferentes moléculas de HRGP. También se sabe que la HRGP se entrecruza con otros componentes de la pared celular por un mecanismo aún desconocido. Experimentalmente, las HRGPs son sumamente difíciles de extraer de las paredes celulares. Es posible que el entrecruzamiento se derive de la peroxidación de la HRGP al exponerse a EROS y a iones Fe^{2+} . La formación de los hidroperóxidos inicia una reacción en cadena, donde los aminoácidos Val, Pro y Lys son fáciles de peroxidar y abundantes en estas proteínas. Aunque la His no se peroxida fácilmente, se puede oxidar abriendo su anillo imidazol y generando un aldehído y un grupo amino, capaz de formar una base de Schiff con el grupo ϵ -amino de la Lys y formar un puente estable proteína-proteína (Cassab, 1998). Se ha demostrado que cuando células vegetales de chícharo se exponen a H_2O_2 se incrementa la insolubilización de proteínas, mientras que el tratamiento con catalasa o inhibidores de peroxidasas bloquean el proceso iniciado por elicitores o H_2O_2 . Asimismo existe evidencia que sugiere que el H_2O_2 derivado del estallido respiratorio estimulado por elicitores es el causante de la insolubilización de las HRGPs en las paredes celulares de células en suspensión. La secuencia *N*-terminal parece ser importante para la formación de los puentes de isoditrosina (Otte y Barz, 2000).

Los precursores de la HRGP se pueden detectar desde etapas tempranas de la formación de la pared celular, sin embargo, al detenerse el crecimiento celular se encuentra un incremento en los niveles de HRGP asociada a esta estructura. En algunos tipos celulares, la incorporación de HRGP a la pared celular prepara a la célula para detener su crecimiento y determinar su morfología final (Cassab, 1998).

La variabilidad en el contenido de aminoácidos diferentes de Hyp en los motivos repetitivos y en los perfiles de arabinosilación en las diferentes HRGPs, pueden ser específicos de especie o de tejido. En algunos casos, existen varias extensinas en el mismo tejido o tipo celular. Esto puede significar que tienen diversas funciones de acuerdo con el tipo celular o incluso dentro de la misma célula o tejido. La distribución de las HRGPs en diferentes plantas y tejidos se ha estudiado con inmunocitoquímica, impresión de tejidos e hibridación *in situ*. Los resultados muestran que las extensinas se localizan preferentemente en las células del esclerénquima y del cambium, aunque también se asocian con el xilema secundario y el floema. Sin embargo, los resultados obtenidos de estos experimentos no son muy precisos ya que los anticuerpos y las sondas utilizadas no eran específicos (Cassab, 1998).

5.3.2. Expresión durante el desarrollo

Durante el desarrollo la expresión de la HRGP está altamente regulada. En jitomate se aisló un gen que codifica una extensina (*LeExt1*) a partir de una biblioteca de cDNA de pelos radiculares. Al estudiar los patrones de expresión se demostró que este gen se expresa en la zona de diferenciación de la rizodermis y se encontró una correlación directa entre la expresión de *LeExt1* y el crecimiento de la punta de la raíz (Bucher *et al.*, 2002).

La expresión de la HRGP no sólo se regula con el desarrollo, sino que se puede inducir por diversos tipos de estrés, como daño mecánico, infección por hongos y virus, elicitores y tratamiento con etileno (Yoshida *et al.*, 2001; Ahn y Lee, 2003).

En *A. thaliana* se aislaron cuatro cDNAs que codifican 4 extensinas diferentes (*AtExt2-5*) y que contienen los motivos característicos Ser-(Hyp)₄. Estos genes se expresan abundantemente en la rehidratación de plantas sometidas a estrés por sequía, así como cuando las plantas son tratadas con L-Ser, Hyp y L-Pro, aminoácidos principales de las extensinas. Los transcritos de *AtExt2,3* y *5* se detectaron en el tallo bajo y en los botones de las flores, mientras que *AtExt4* se detectó en las flores. Aparentemente, los genes de extensinas en *A. thaliana* se expresan bajo diferentes condiciones y en distintos tejidos (Yoshida *et al.*, 2001). Un fenómeno similar ocurre en frijol, donde 3 diferentes HRGPs se expresan de manera diferencial cuando suspensiones celulares fueron expuestas a patógenos compatibles, incompatibles, elicitores y daño mecánico (Corbin *et al.*, 1987).

5.3.3. Expresión durante la respuesta a estrés

Ahn y Lee (2003) aislaron en soya un gen que codifica una extensina específica de raíz (*SbHRGP3*) que se induce por heridas y demostraron que la sacarosa es la señal específica que regula la expresión del gen; asimismo, el gen de la HRGP se induce por daño tisular en el alga verde *Volvox* (Ender *et al.*, 1999).

Las HRGPs contribuyen a la defensa de la planta, ayudando a proteger contra el ataque de patógenos y el daño mecánico. Los estudios inmunocitoquímicos demuestran que las HRGPs se acumulan en las paredes celulares cercanas al sitio de la HR. Es posible que las HRGPs actúen como barreras físicas o que inmovilicen al patógeno uniéndose a su superficie.

Esto es factible gracias a que las HRGPs están cargadas positivamente y pueden interactuar iónicamente con las superficies cargadas negativamente del patógeno (Cassab, 1998).

Algunos microorganismos que infectan a las plantas han desarrollado mecanismos para penetrar las paredes celulares reforzadas con HRGP. Tal es el caso de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, una bacteria que infecta al nabo (*Brassica campestris*). Este organismo posee una actividad enzimática de proteasa capaz de degradar las HRGPs de jitomate, papa y nabo (Dow *et al.*, 1998). En la interacción simbiótica entre *Rhizobium* y la planta de chícharo, las señales bacterianas relacionadas con la capacidad fijadora de nitrógeno son responsables de la regulación de la expresión de la HRGP en los nódulos radiculares (Olsson *et al.*, 2002).

En cereales, la función de la pared celular en la resistencia a enfermedades aún no es completamente entendida. Se ha asociado el engrosamiento de la pared celular con el ataque de patógenos en diversos cereales y este reforzamiento correlaciona con la resistencia a *Pseudocercospora* en trigo. En este cereal se ha observado deposición muy localizada de HRGPs ricas en treonina en interacciones planta-patógeno tanto compatibles como incompatibles (El-Gendy *et al.*, 2001).

El tratamiento de células de frijol con un elicitor fúngico o glutatión causa la insolubilización rápida (2-5 min) de las proteínas HRGP en la pared celular. Se ha demostrado que una elicitación corta (30 min) hace a la pared celular más resistente a la digestión enzimática. Este efecto se puede atribuir al entrecruzamiento proteico, ya que es insensible a la inhibición de la transcripción y traducción y se induce por la aplicación de H₂O₂ exógeno. Los galacturónidos, que son elicitores, inducen la expresión del gen de la HRGP y promueven un incremento del 40-70% de Hyp en la pared celular (Cassab, 1998).

El promotor que regula la expresión del gen de la HRGP en *Brassica napus* (*extA*) tiene un mecanismo de control complejo, siendo regulado por 4 grupos de regiones *cis* que actúan positiva o negativamente y que controlan la inducción por heridas, la activación en respuesta al estrés por tensión y los niveles de expresión (Elliott y Shirsat, 1998).

5.3.4. La HRGP de maíz

La HRGP es la proteína más abundante extraída de pared celular de maíz (García Muniz *et al.*, 1998). Es una proteína rica en treonina con secuencias altamente repetitivas, ya que contiene 13 repeticiones de un péptido rico en prolina y treonina. Presenta únicamente un motivo Ser-Pro₄, comúnmente encontrado en las extensinas (Stiefel *et al.*, 1990).

La proteína predicha a partir del cDNA comienza con una secuencia hidrofóbica que tiene las características típicas de un péptido señal y que dirige el transporte desde el retículo endoplásmico hasta la pared celular. La secuencia de la proteína madura comienza con un residuo de ácido aspártico en posición 27, seguido por un segmento de 8 residuos de glicina y tirosina. Posteriormente se encuentra una región rica en prolina que incluye repeticiones del péptido Gly-Pro-Lys-Pro-(Asp/Glu)-Lys-Pro-Pro-Lys-Gly-His. Finalmente, existe una región rica en prolina y treonina. La proteína no glucosilada tiene secuencias hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas, como se muestra en la figura 12 (Stiefel *et al.*, 1990):

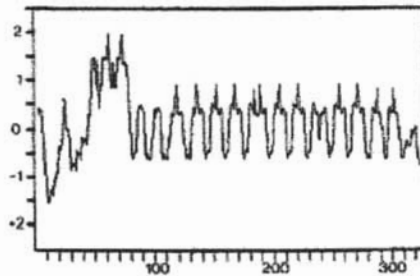


Figura 12. Perfil hidropático de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la clona genómica de la HRGP de maíz (Stiefel *et al.*, 1990).

Los residuos de tirosina en la proteína se encuentran localizados en un patrón regular en las partes más hidrofóbicas de la molécula. Se ha propuesto que estos residuos son los sitios de polimerización de la proteína (Stiefel *et al.*, 1990).

Al realizar un SDS-PAGE, la HRGP migra como una banda difusa de aproximadamente 70 kD, probablemente debido a la glicosilación y a su alto contenido de prolina, ya que el peso molecular predicho para la proteína es de aproximadamente 36 kD (Stiefel *et al.*, 1990).

Por análisis de Southern Blot en 4 diferentes variedades de maíz se determinó que el genoma contiene una o dos copias del gen, dependiendo de la variedad de maíz. En los cereales es común que las HRGPs se encuentren como copias únicas o en bajo número de copias, en contraste con las múltiples copias de las extensinas de las dicotiledóneas. Esto implica que un solo gen debe responder a diversos estímulos ambientales. El gen de maíz se mapeó por RFLPs, encontrándose en un *locus* único en el cromosoma 2 de maíz (Stiefel *et al.*, 1990; García Muniz *et al.*, 1998).

El promotor del gen *Hrgp* ha sido analizado mediante bombardeo de partículas, utilizando construcciones del promotor completo y deleciones de éste con un gen reportero. Se encontró un elemento silenciador putativo específico para tallos jóvenes en la región del promotor localizada en -1076/-700. Otros elementos *cis* importantes para la expresión de *Hrgp* están localizados en las regiones -699/-510 y -297/-160. Las secuencias cercanas al ATG de inicio y el líder de mRNA también son importantes, ya que cuando se elimina la región de -52/+16 (que contiene la caja TATA) hay una reducción del 75% en la actividad del promotor (Menossi *et al.*, 2003).

El gen de maíz contiene un intrón en el extremo 5'UTR. Al realizar una comparación entre las secuencias del intrón de maíz con el de arroz y teosinte, se encontró un alto grado de conservación, lo que indica que el intrón podría ser relevante en la expresión del gen. Los intrones pueden incrementar la expresión de la proteína facilitando el transporte del RNA al citoplasma, protegiendo el RNA nascente del ataque de nucleasas, facilitando la adición de la cola poliA durante el procesamiento del intrón e incluso incrementando la transcripción. La mayoría de los intrones vegetales que no interrumpen la región codificante están localizados en el extremo 5'UTR. Sin embargo, varios genes que codifican proteínas de pared celular contienen un intrón en la región 3'UTR, incluyendo los homólogos de *Hrgp* en teosinte, sorgo, arroz, zanahoria, jitomate y posiblemente en tabaco. Al realizar un análisis de la influencia del intrón de *Hrgp* de maíz se encontró que la construcción que contiene el intrón presenta el doble de actividad que la construcción que no lo contiene. En tallos jóvenes, el intrón incrementó la actividad de GUS, dirigida tanto por el promotor de *Hrgp* como por el 35S. Sin embargo, en la construcción con el promotor de *Hrgp*, el intrón duplicó la actividad del gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS), mientras que en las construcciones con el promotor 35S incrementaron la actividad en un 40-60%.

Aparentemente, la participación del intrón en la regulación de la expresión del gen es específica de tejido, ya que el incremento en la expresión por el intrón se observó únicamente en tallos jóvenes y en células de maíz BMS en cultivo (Menossi *et al.*, 2003).

Existe evidencia que indica que el gen *Hrgp* es activo en respuesta a diversas situaciones durante la vida de la célula. Su expresión es paralela a la acumulación del mRNA de histona H1 en tejidos que se dividen activamente. El mRNA de la HRGP también se encuentra en tejido dañado y se acumula transitoriamente en los sitios de vascularización en embriones en germinación, raíces y hojas (Ruíz-Ávila *et al.*, 1992).

Durante la embriogénesis, el mRNA de la HRGP se acumula 20 días después de la polinización, principalmente en el eje embrionario y en el suspensor y desaparece durante las etapas de maduración de la embriogénesis, así como en semillas secas. El gen también se expresa abundantemente en los meristemos florales durante el desarrollo del pistilo (José-Estanyol y Puigdoménech, 1998).

Se ha observado especificidad tisular por análisis inmunológicos y de Northern Blot en embriones de maíz. Los resultados de estos ensayos muestran que la acumulación del mensajero de la HRGP es principalmente en el eje embrionario, en etapas tempranas de la diferenciación, antes de la adquisición de la forma de la célula. El mayor nivel de mRNA se presenta en las células en división (principalmente en el nodo del coleoptilo, la plúmula y el ápice de la raíz) y en las células provasculares, mientras que en el escutelo no están presentes ni el mRNA ni la proteína HRGP (Ruíz-Ávila *et al.*, 1992; García Muñiz *et al.*, 1998). La abundancia de mRNA de la HRGP disminuye drásticamente en los tejidos maduros, especialmente en aquellos que se encuentran en fase de elongación o en órganos diferenciados (Stiefel *et al.*, 1990; García Muniz *et al.*, 1998).

García Muniz y colaboradores (1998) analizaron el efecto de diversos compuestos relacionados con la respuesta de maíz al ataque de patógenos sobre la expresión del gen *Hrgp*. Al aplicar extractos crudos de micelios de hongos patógenos y no patógenos para el maíz, detectaron acumulación de mRNA de la HRGP, dependiente de la concentración y tiempo de exposición. Utilizando inmunolocalización por impresión tisular, se encontró que en las plántulas de maíz etioladas expuestas a un elicitador se acumula la proteína HRGP y que se producen cambios morfológicos similares a los producidos por etileno. La acumulación mediada por un elicitador se regula de manera tejido-específica.

Los incrementos más altos en la acumulación de HRGP se observaron en el mesocotilo, en el cual el nivel basal (del control) es muy bajo. La acumulación de la proteína por el elicitor es aparentemente mayor en la epidermis y en las células de la corteza externa del mesocotilo (García Muniz *et al.*, 1998).

Uno de los primeros eventos en las interacciones planta-patógeno es un rápido incremento de la biosíntesis de etileno y se sabe que diversos genes relacionados con la defensa se encuentran regulados por esta hormona. En maíz, la aplicación de un precursor inmediato de la síntesis de etileno (ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) induce la acumulación de mRNA de la HRGP (García Muniz *et al.*, 1998). Al realizar un análisis del promotor, usando células de maíz transformadas por bombardeo de partículas, Menossi y colaboradores (1997) concluyeron que este promotor contiene un elemento putativo de respuesta a etileno, el motivo GGGAAGCCTCC que contiene una caja imperfecta (TCC) y otra perfecta (GCC) que en tabaco responden a la hormona (Menossi *et al.*, 1997).

El inhibidor de cinasas de proteína, estaurosporina, evita la acumulación del mRNA de la HRGP, por lo que la fosforilación de proteínas es un evento involucrado en la vía de transducción de señales iniciada por el elicitor (García Muniz *et al.*, 1998). Ni el ácido salicílico (1 mM) ni el metil jasmonato (5 μ M) produjeron un incremento en la acumulación de mRNA de HRGP. Sin embargo, el ácido ascórbico y el glutatión reducido incrementaron la acumulación de mRNA. Se ha reportado que la presencia de estos antioxidantes induce los genes de defensa en otras especies vegetales. En contraste con la inducción de *Hrgp* mediada por elicitores, el etileno no parece estar involucrado en la inducción del gen en respuesta al ácido ascórbico, ya que los inhibidores de la síntesis de etileno no bloquearon la acumulación del mRNA. Se observó que la acumulación del mRNA producida por elicitores fúngicos es más rápida que la producida en respuesta al ácido ascórbico. Estos resultados sugieren que existen por lo menos dos vías diferentes de inducción del gen *Hrgp*: la vía mediada por elicitores y etileno y la vía independiente de etileno que depende de ácido ascórbico. La inducción del mismo gen por diferentes vías podría permitir la activación de grupos específicos de genes de defensa en respuesta a condiciones biológicas cambiantes (García Muniz *et al.*, 1998).

El daño tisular induce la hidroxilación de prolina dependiente de ascorbato, reacción requerida para la acumulación de HRGP en la pared celular. Estos datos sugieren la posibilidad de que la acumulación de mRNA de HRGP inducida por ácido ascórbico esté relacionada con la respuesta a heridas (García Muniz *et al.*, 1998).

II. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Se ha demostrado que la FB1 y la toxina AAL, producida por el hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* inducen incrementos en los niveles de bases esfingoideas en tabaco, jitomate y *Lemna pausicostata* (Abbas *et al.*, 1994); sin embargo, esto no se había demostrado en maíz, que es el hospedero natural de *Fusarium verticillioides*. En ejes embrionarios de maíz germinados en medio MS, expuestos a una dosis de 10 μM de FB1 se observó que los niveles de esfinganina y fitoesfingosina aumentan. La esfinganina alcanza un máximo de acumulación de aproximadamente 7 veces con respecto al control a las 24 horas de germinación, mientras que la fitoesfingosina se acumula en una proporción similar alrededor de las 60 horas de germinación (Rivas San Vicente, 2001).

También se demostró que la concentración mínima de FB1 capaz de causar acumulación de bases esfingoideas en ejes embrionarios de maíz es de 0.5 μM y que existe una correlación entre la acumulación de bases esfingoideas y la inhibición de la elongación radicular (Rivas San Vicente, 2001).

La FB1 también induce la expresión del gen *ZmHrgp* en ejes embrionarios de maíz expuestos durante la germinación y se detectó una mayor cantidad de transcrito en las muestras tratadas con FB1 en comparación con las muestras control a partir de las 6 horas de germinación, alcanzando un máximo a las 24 horas de germinación (San Juan Badillo, 2001).

III. HIPÓTESIS

Debido a que la FB1 induce la expresión de genes de defensa como la HRGP, así como una elevación en los niveles de bases esfingoideas, se postula que estos esfingolípidos participan en la señalización que precede y regula la expresión del gen de la HRGP en células vegetales.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de los esfingolípidos en el mecanismo de señalización que da origen a la inducción del gen de la *Hrgp* observada en presencia de FB1.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los niveles de bases esfingoideas en embriones de maíz durante la germinación y en presencia de distintas dosis de FB1.

Analizar el efecto de diferentes dosis de FB1 sobre la expresión del gen de la HRGP en ejes embrionarios durante la germinación.

Determinar el efecto de esfingolípidos exógenos en la expresión del gen de la HRGP en ejes embrionarios de maíz.

Determinar el efecto de inhibidores de la biosíntesis de bases esfingoideas en la expresión del gen de la HRGP.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico

Se emplearon semillas de maíz de la raza "Chalqueño" obtenidas en Chalco, Estado de México en 2002 y 2003.

2. Elaboración de las curvas de germinación de semillas de maíz en ausencia y presencia de FB1 y determinación de la longitud del coleoptilo y de la radícula

Las curvas de germinación se realizaron para determinar la viabilidad y el porcentaje de germinación de las semillas en presencia de FB1. Se realizó un análisis estadístico de la inhibición en el crecimiento de la radícula y del hipocotilo con la finalidad de determinar la dosis de FB1 que se emplearía en todos los experimentos.

Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad. Se desinfectaron lotes de 30 semillas de maíz lavándolos con hipoclorito de sodio (Cloralex diluido 1/10) durante dos minutos, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril.

Se seleccionaron los tiempos de muestreo de 12h, 24h, 36h, 48h y 72h. Para cada tiempo se prepararon tres cajas petri con agar al 1.2%, que contenían concentraciones de FB1 (preparada con acetonitrilo-agua 1:1) de $0\mu\text{M}$, $0.1\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$, y se sembraron 10 semillas en cada caja. A la muestra control ($0\mu\text{M}$ FB1) se le añadieron 2.5 mL de acetonitrilo-agua 1:1.

Las cajas se incubaron a 29°C y al finalizar el tiempo de incubación, se contaron las semillas germinadas y no germinadas y se midió la longitud de los coleoptilos y radículas. Con los datos anteriores se determinó el porcentaje de germinación y se realizó un análisis de varianza de una vía de la longitud de la radícula y el hipocotilo para los diferentes tratamientos utilizando el programa Statistix 4.0 ($p = 0.05$).

3. Método para la extracción de bases esfingoideas con acetato de etilo (Rivas San Vicente, 2001)

Se sembraron las semillas como se describió para la elaboración de curvas de germinación y posteriormente se extrajeron los embriones manualmente con ayuda de una navaja. Se realizaron tres extracciones independientes para cada tiempo (0, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h) y dosis seleccionadas (0.0, 0.1, 1 y 10 μM de FB1).

a) Reactivos:

Solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) 50 mM, pH 7

Estándar interno de esfingosina 100 μM

Solución de KCl al 0.8%

Hidróxido de potasio 1 M

Acetato de etilo

b) Homogenización:

Congelar los ejes embrionarios de maíz (de 250 a 300 mg, registrando el peso) en nitrógeno líquido y pulverizarlos en el mortero.

Rehidratar el tejido pulverizado con solución amortiguadora de K_2HPO_4 (50 mM pH 7) añadiendo 400 μL por cada 100 mg de tejido.

Transferir de 400 a 500 μL de homogenado a un tubo de plástico de 15 mL con tapón de rosca.

c) Extracción de lípidos

Añadir 1.5 mL de solución de KCl al 0.8%, 50 μL de KOH 1 M, 4 mL de acetato de etilo y 6 μL de estándar de esfingosina 100 μM .

Tapar el tubo y extraer por agitación suave durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Separar las fases por centrifugación a 3,600 rpm (Centrífuga Jouan MR1812, rotor 67) durante 15 minutos.

Transferir la fase orgánica (superior) a un tubo de ensayo e iniciar la evaporación a 55° C bajo corriente de nitrógeno; cuando el volumen sea menor o igual a 1.5 mL, transferir a un vial de vidrio de 2 mL y continuar la evaporación a sequedad.

4. Cuantificación de bases esfingoideas (Castegnaro *et al.*, 1998; Rivas San Vicente, 2001)

Se determinaron los niveles de esfingosina (estándar interno), esfinganina y fitoesfingosina en los extractos de embriones de maíz por el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para esta técnica se forma un derivado fluorescente de la base esfingoidea con *o*-ftaldialdehído (OPA) que se separa en una columna de fase reversa. El equipo empleado se conformó por una bomba, un detector de fluorescencia y un procesador de datos, marca Shimadzu, modelos LC-10ADVP, RF-10AXL y C-R5A respectivamente. La separación de bases esfingoideas se realizó en una columna Supelcosil™ LC-18-S, 5 μ m (15 cm x 4 mm).

a) Reactivos (ver apéndice):

Etanol absoluto

Solución de OPA

Solución amortiguadora de fosfatos 5 mM (pH 7)

Metanol grado HPLC

b) Condiciones del separación y detección

Longitud de excitación-emisión: 337-448

Sensibilidad: 1

Flujo: 2 mL/min

Fase móvil: Metanol – solución amortiguadora de fosfatos (5 mM, pH 7) 89:11

Atenuación: 6

Bajo estas condiciones los tiempos de retención de las bases esfingoideas fueron los siguientes: fitoesfingosina (tiempo de retención, T_R = 3.6-4.2 min), esfingosina (T_R = 5.5-6.2 min) y esfinganina (T_R = 7.8-8.2 min), lo que permitió la cuantificación y elaboración de curvas de calibración.

Tabla 1. Preparación de las curvas de calibración de fitoesfingosina, esfingosina y esfinganina.

Concentración del estándar de la base esfingoidea (μM)	Alicuota (μL)	μL de fase móvil	μL de OPA	Concentración final ($n\text{M}$)	μmoles inyectadas en 20 μL
0.1	3	227	20	1.2	0.024
0.1	5	225	20	2	0.04
0.1	7	223	20	2.8	0.056
0.1	9	221	20	3.6	0.072
0.1	11	219	20	4.4	0.088
0.1	13	217	20	5.2	0.104

d) Procedimiento para el análisis de bases esfingoideas en los extractos.

Resuspender el extracto seco en 400 μL de etanol absoluto y sonicar durante 5 min (la concentración final del extracto queda entre 0.25 y 0.3 $\text{mg}_{\text{tejido}}/\mu\text{L}$).

Tomar diferentes cantidades de extracto (2 y 20 μL) y añadir 40 μL de OPA, 100 μL de solución amortiguadora de fosfatos 5 mM y llevar a un volumen final de 500 μL con metanol-agua (9:1). Sonicar durante 10 minutos.

Inyectar las muestras y los estándares al HPLC.

5. Extracción de RNA total

Se utilizaron 25 ejes o 5 embriones de los diferentes tiempos de germinación (independientemente del peso, que oscila entre 100 y 300 mg) y se colocaron en un mortero estéril, agregándoles nitrógeno líquido para congelarlos. El material congelado se molió hasta obtener un polvo fino, se le añadió 1 mL de TRIzol® de GIBCO BRL, se homogenizó y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL.

El homogenado se incubó a temperatura ambiente durante 2.5 minutos, para después centrifugar a 12,000 rpm a 4° C durante 10 minutos (centrífuga Jouan MR1812, rotor con número de catálogo 11174590). El sobrenadante se transfirió a tubos limpios, se agregaron 0.2 mL de fenol-clorofórmico 1:1 a cada uno y se agitaron durante 15 segundos. Las mezclas se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C durante 10 minutos y las fases acuosas se transfirieron a tubos eppendorf limpios a los que se agregaron 0.5 mL de isopropanol y se incubaron a

temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez concluida la incubación, se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm a 4° C durante 10 minutos, los sobrenadantes se decantaron y los botones se lavaron con 1 mL de etanol al 70% a -20°C, preparado con agua tratada con DEPC. Después se centrifugaron a 6,400 rpm a 4°C durante 5 minutos, los sobrenadantes se decantaron, dejándose secar los botones durante 4 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los botones obtenidos en cada tubo eppendorf se resuspendieron en 100 µL de agua tratada con DEPC. Se almacenaron a -20°C.

6. Preparación de DNA de plásmidos (miniprep)

Se centrifugaron 1.5 mL del cultivo de células transformadas a 12,000 rpm durante 1 minuto en una centrífuga Sorvall MC12 FA-MICRO y se eliminó el sobrenadante por aspiración. El botón se resuspendió con una pipeta en 200 µL de buffer GTE y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 300 µL de NaOH 0.2N/SDS 1% recién preparado, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se agregaron 300 µL de acetato de potasio 3M, pH 4.8, se mezcló el tubo por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Una vez concluida la incubación se centrifugó el tubo a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4° C en una centrífuga Jouan MR1812 con un rotor Jouan (número de catálogo 11174590) y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, al cual se agregaron 5 µL de RNAsa GIBCO (concentración 15 mg/mL). La mezcla anterior se incubó durante 1.5 horas a 37° C. Transcurrido este tiempo, se realizó una extracción con 400 µL de fenol-cloroformo (1:1) y se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 12,000 rpm en una centrífuga Sorvall MC12 FA-MICRO. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se realizó una extracción con 400 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v). Posteriormente se precipitó el DNA por la adición de 700 µL de isopropanol e incubando a -20° C durante 20 minutos. Para obtener el botón de DNA, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4° C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 mL de etanol al 70%. El etanol se eliminó por centrifugación a 12,000 rpm durante 5 minutos a 4° C, se decantó el sobrenadante y el resto del etanol se evaporó a temperatura ambiente. El botón de DNA se resuspendió en 20 µL de agua estéril.

Para las muestras que se secuenciaron, se realizó un paso más de purificación que consistió en precipitación con 8 μL de PEG al 13% y 20 μL de NaCl 4M. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a -20°C y posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C . Finalmente se realizó un lavado con etanol al 70%, las muestras se dejaron secar al aire y se resuspendieron en 20 μL de agua estéril.

7. Cuantificación de DNA por espectrofotometría

Se disolvió 1 μL de DNA en 1 mL de agua desionizada estéril y se cuantificó en el espectrofotómetro en celdas de cuarzo a 260 nanómetros.

8. Método de digestión de plásmidos

El plásmido que contiene la sonda de HRGP (donada por P. Puigdomenech, Raz *et al.*, 1992) se desnaturalizó por 5 min a 100°C con 2 μL de buffer B (10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol, pH 8) y posteriormente se agregaron 1 μL de *EcoRI*, 1 μL de *HindIII* y agua hasta un volumen final de 20 μL . Se digirió durante 1 h a 37°C .

Para los plásmidos que contenían las secuencias amplificadas en el proyecto, se utilizó el vector pGEM-T easy Vector (Promega) y se realizó la digestión con *EcoRI* y buffer 3 siguiendo el procedimiento descrito.

Se realizó la separación por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, a 80V, durante 1 h.

9. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Se empleó el Kit GENECLEAN III (BIO 101). Las bandas de interés del gel de agarosa al 1% se cortaron y se colocaron en tubos eppendorf. Después se calculó el volumen del gel con el DNA (0.1 g equivalen a 100 μL) y se agregaron al tubo 4.5 volúmenes de NaI. Los tubos se colocaron en baño maría a $45-55^\circ\text{C}$ durante 5 minutos aproximadamente, con movimientos de agitación cada minuto hasta que el gel se disolvió completamente, después de lo cual se añadieron 5 μL de resina Glass Milk previamente agitada, y se incubó durante 5 minutos a

temperatura ambiente, nuevamente con agitación. Se centrifugó a 12,000 rpm en una centrífuga Sorvall MC12 FA-MICRO durante 5 segundos y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 700 μL de New-Wash y se resuspendió el botón con ayuda de una pipeta. Se repitieron los lavados con New-Wash dos veces más, eliminando completamente el New-Wash en el último lavado. Se agregaron por último 15 μL de agua estéril, se calentó a 50 °C durante 3 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 segundos. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo limpio sin tocar el botón.

10. Marcaje de la sonda con [^{32}P]-dCTP por la técnica de random primer

Se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL 12 μL de DNA purificado a partir de un gel de agarosa y 9 μL de agua. El tubo se calentó a 100° C durante 5 minutos y se enfrió inmediatamente en un baño de hielo. Se agregaron 3 μL de una mezcla de dATP (500 μM), dGTP (500 μM) y dTTP (500 μM), 20 μL de Random Primer Solution 2.5X y 1 μL de Klenow DNA polilmerasa I, provenientes del kit RadPrime DNA Labelling System de GIBCO BRL. A la mezcla anterior se le añadieron 5 μL de [α - ^{32}P]dCTP mezclando suavemente. Se incubó durante 1 hora a 37°C en un contenedor de plomo y concluido este tiempo se añadieron 100 μL de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM).

Para purificar la sonda se hicieron pasar 75 μL de DNA marcado por una columna de Sephadex 50 (una jeringa de insulina empacada con Sephadex 50 hasta la marca de 0.8 mL), centrifugándola durante 5 minutos a 2000 rpm en la centrífuga Sorvall RT 6000D. La sonda se almacenó a -20° C en un contenedor de plomo hasta su uso.

11. Elaboración de un gel desnaturalizante

Se preparó un gel de agarosa al 1.2% de la siguiente manera: 1.82 g de agarosa, 15 mL de MOPS 10X y se aforaron a 150 mL con agua tratada con DEPC. Se preparó la siguiente mezcla para la desnaturalización del RNA:

Tabla 2. Mezcla para desnaturalización de RNA

Reactivo	Cantidad
DMSO	22.5 μ L
MOPS 1X	5.0 μ L
Glioxal 6M desionizado	6.6 μ L
RNA	10 μ g
Agua tratada con DEPC	cbp 45 μ L

Las muestras se incubaron a 50°C durante 1 hora, se enfriaron en hielo y se les adicionaron 6 μ L de buffer de carga para RNA. Se corrió el gel a 150 V a 4°C por 2.5 horas utilizando como solución amortiguadora de corrida MOPS 1X.

12. Northern Blot

a) Transferencia del RNA del gel a la membrana de nylon:

Se montó el dispositivo que se muestra en la figura 13.

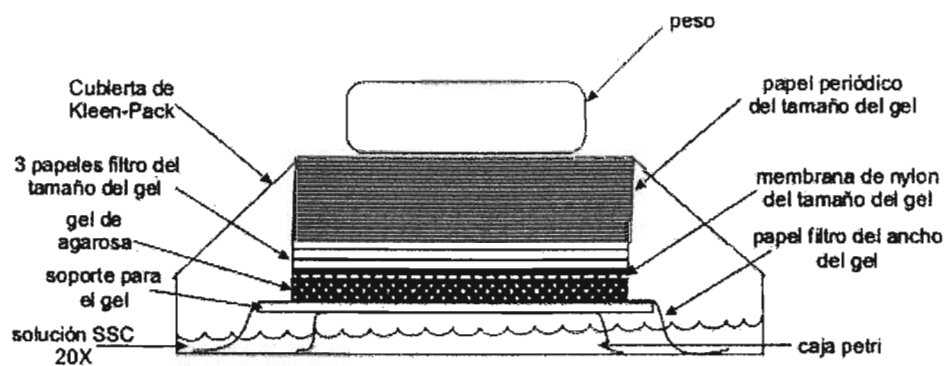


Figura 13. Dispositivo para realizar la transferencia del RNA del gel a la membrana de nylon.

La transferencia se realizó durante 18 horas como mínimo. Una vez concluido ese tiempo, la membrana se lavó durante 5 minutos en SSC 20X estéril y se dejó secar al aire. El RNA se fijó a la membrana mediante luz ultravioleta, aplicando 2 ciclos de "Optimal Crosslink" en un equipo UVC 500 Ultraviolet Crosslinker HS1.

b) Teñido de la membrana:

La membrana de nylon seca se teñió con azul de metileno hasta que las bandas de RNA fueron claramente visibles. Posteriormente se enjuagó con agua desionizada para eliminar el exceso de colorante.

c) Hibridación

Prehibridación: Se colocó la membrana de nylon en un tubo de hibridación y se colocaron 15 mL de solución de hibridación (Ver apéndice). La membrana se prehibridó durante 2 horas a 68° C en un horno Hybaid® Micro-4.

Hibridación: Se eliminó la solución de prehibridación y se agregaron de 8 a 10 mL de solución fresca. Se agregaron 150 µL de sonda marcada y se hibridó la membrana a 68° C durante 16-24 horas.

d) Lavados

Una vez transcurrido el tiempo de hibridación, se realizaron varios lavados, con la finalidad de eliminar la sonda que no se unió específicamente, por lo que para determinar el número de lavados a realizar, se midió la radiación emitida con un contador Geiger marca Technical Associates, modelo PUG 1AB, tomando en cuenta que únicamente se debe observar emisión de radiación superior a 100 cpm en una región muy definida de la membrana. Los lavados utilizados incrementan su astringencia progresivamente y fueron los siguientes:

Primer lavado: Solución SSC 2X/SDS 0.1% durante 15 minutos a temperatura ambiente en el tubo de hibridación.

Segundo lavado: Solución SSC 1X/SDS 0.1% durante 10 minutos a 55° C.

Tercer lavado: Solución SSC 0.5X/SDS 0.1% durante 10 minutos a 55° C.

Cuarto lavado: Solución SSC 0.1X/SDS 0.1% durante 10 minutos a 55° C.

e) Exposición de la membrana y revelado de la película

La membrana de nylon se colocó sobre un soporte de acetato eliminando todas las burbujas y se cubrió con película plástica y se colocó dentro de un cassette para exposición radiográfica. Posteriormente, en el cuarto oscuro se colocó una película Kodak, se guardó el cassette en una bolsa negra y se almacenó de dos a cinco días. Transcurrido el tiempo especificado, las películas se revelaron. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas en las autorradiografías.

13. Ensayo de transcriptasa reversa – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

En los ensayos de expresión del gen de la HRGP se encontraron dos bandas con patrones de expresión similares. Para determinar si las dos bandas observadas se debían a la presencia de un intrón en la secuencia de la HRGP, se diseñaron oligonucleótidos con base en la secuencia del gen que amplificaran un posible cDNA que contuviera el intrón.

Secuencia del gen de la HRGP

5'UTR { 2041 cgaggccccc accccacccc ttectccgtg tatataagca gtggcagggt gacgctctct
 2101 cctcagacca ccaactgccc attggccagc tagagccaac cagaagagct tgcagttact
 2161 gagagtgtgt gtgagagaga ggatgggtgg **cagcggcagg gctgctctgc tgctggccct**

ORF { 2221 **ggtggtggtg gccgtgagcc tggccgtgga gatccaggcc gacgccgggt acggttacgg**
 2281 **cgggcgggtac accccgacgc cgaagccggc caccocgacc cogaagcccg agaagccccc**
 2341 **caccaagggg ccgaagccgg acaagccgcc caagagacac gggcccaagc cggagaagcc**
 2401 **gccaagggag cacaagccga cgcgcccac gtacaccccg agccccaaac ccacgccgcc**
 2461 **gacgtacact cccaccccgga cgcaccccaa gccgacgcca cccacataca ctccgcgcc**
 2521 **tacgcccac aaaccacac caaaaccac tcccactcct cogaagtaca ccccgacccc**
 2581 **caagcctccg acacctaagc cgaacccgcc gacgtacact ccaagcccca aacctccgac**
 2641 **gccaagcccg accccaaccga cgtacacccc ttccccaaag cctccgacac ctaagccgac**
 2701 **cccgctacg tacactccaa gccctaagcc accggctacc aagcctccca cgcaccaagcc**
 2761 **gaccccgcca acgtacaccc cttcgccaaa gcctccgaca cccaagccga ccccgccgac**
 2821 **gtacaccct tctcccaagc ctccgacgcc caagccgacc ccgcccagct aactccaag**
 2881 **cccaagcct cccacacacc cgaagcccaa gccgacccca cogaagtaca ccccttcccc**
 2941 **aaagcctccg acgcccagc cgacccacc gacgtacacc ccttcccaag agcctccgac**
 3001 **acccaagccg accccaaccga cgtacacccc ttccccaaag cctccgacac ccaagccgac**
 3061 **cccaccgacg tacactccca caccgaagcc gccgcccacc aagccgccc cctacactcc**


```

3121 gacgcgcgcg gtgtctcaca cccccagccc gcgcgccacca tactactaga aagcgtatgc
3181 taacataaca caatgctgtc agtctctgga gcatttaggt acgtactagt actacgtata } Intrón
3241 cgtacaagaa tggagcatgc aatgtgcatg cacactgcat acatttagta tgtgcttgtg
3301 tcaaatgtat cgtcagtatc atactgatct cctggcatag tctggcacta accataggct
3361 ctccctttct tttgtgttgg acaggtggtc tggatcaatg gaagggttgt gtcctagcca
3421 gcgggcaaa atgagctgct gatgtaatg atgatgataa gagaccactg ctacgtaccc
3481 tcctcctttg tgtggtgcca tcogtcccog ctagaogatc gaggagagaa tagcagagct } SstI
3541 ctgtgctccc ggcctctgtc ttctcogtcc cggcogtta attactagt gtgttogtcc
3601 ctatatgttt agcagcagca gttgtattgt gcgggtatgt aatggtattg caactatatt
3661 ggggtgtaaaa ccataataaa tgtgggcaaa tatgcaagga aaaaaggctt ctactctac
3721 tgtacactta ctacc

```

Fwd604: 5'-cgtacaccccttcccaag-3'

Fwd452: 5'-cctaccataccacactgctgc-3'

Fwdint1: 5'-agaatggagcatgcaatgtg-3'

Fwdint2: 5'-gttgacaggtgctgctgat-3'

Rev101: 5'-acaatacacctgctgctctaa-3'

a) Síntesis de la primera cadena de cDNA:

Se colocó en un tubo eppendorf 1 µg de RNA total (1 OD = 30 µg/µL de RNA), 4 µmoles de oligonucleótido reverse y agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 12 µL. La mezcla anterior se incubó a 70° C durante 10 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo. Posteriormente se le añadieron 4 µL de amortiguador de primera cadena 5 X (GIBCO), 2 µL de DTT (ditiotretitol) 0.1 M y 1 µL de una mezcla de dNTPs 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP (GIBCO), cada uno a una concentración 10 mM) y se incubó durante 2 minutos a 42° C. Al finalizar este tiempo se agregó 1 µL de transcriptasa reversa RNasa H-Superscript^(TM) II (GIBCO) de 200 U/µL y se incubó a 42° C durante una hora. La reacción se detuvo calentándola a 70° C durante 10 minutos.

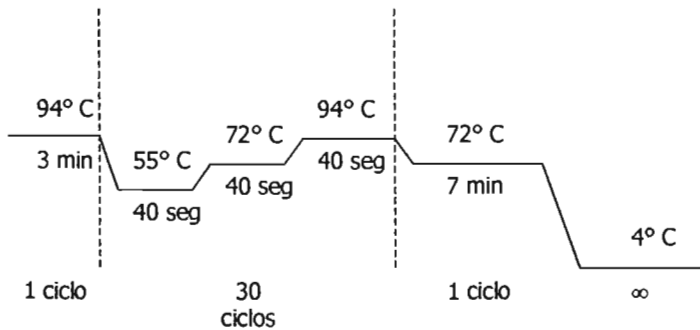
b) Síntesis de la segunda cadena de cDNA:

Para ello se prepararon las diferentes mezclas que se encuentran en la Tabla 3, teniendo como controles aquellos en donde únicamente se adicionó uno de los diferentes oligonucleótidos.

Tabla 3. Preparación de las mezclas para la síntesis de la segunda cadena de cDNA

	Muestra 1	Control 1	Control 2	Control 3
Buffer de PCR (GIBCO)	1 X	1 X	1 X	1 X
MgCl ₂	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
DNTPs (GIBCO)	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
Oligonucleótido 5'→3'	1 μM	1 μM	-	1 μM
Oligonucleótido 3'→5'	1 μM	-	1 μM	1 μM
cDNA	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
RNA total	-	-	-	1 μg
Taq polimerasa (Roche)	5 U	5 U	5 U	5 U
Agua	cbp 25 μL	cbp 25 μL	cbp 25 μL	cbp 25 μL

El proceso de síntesis y amplificación del cDNA se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:



Posteriormente se realizó un gel de agarosa al 1% con un marcador de 100 pares de bases de GIBCO para comprobar la presencia del producto amplificado.

14. Preparación de células competentes

Se inoculó una colonia aislada o una asada de un stock de glicerol de la cepa de *E. coli* DH5α en 10 mL de caldo Luria (LB) en un matraz de 125 mL. Se incubó a 37° C en agitación durante toda la noche y posteriormente se transfirieron 2 mL de cultivo a 200 mL de LB en un matraz de 1 L. Se incubó a 37° C con agitación y cuando la suspensión alcanzó una absorbancia a 590 nm de 0.375 se transfirió el cultivo a 4 tubos Falcon de 50 mL estériles incubándolos en hielo

por 5-10 min. Se centrifugaron las células a 3000 rpm a 4° C durante 7 minutos y se resuspendió cada botón celular en 10 mL de CaCl₂ fría (15 mM), centrifugándolo posteriormente a 3000 rpm durante 5 min. Cada botón fue resuspendido nuevamente en 10 mL de solución de CaCl₂ fría, incubándose durante 30 minutos. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a 4° C durante 7 min. y se resuspendieron los botones celulares en 2.5 mL de CaCl₂ fría, repartiéndose en alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf estériles. Las alícuotas se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y se almacenaron a -70° C (Inoue *et al.*, 1990).

15. Ensayo de ligación del inserto

Para realizar la ligación se utilizó el vector pGEM®-T Easy Vector de Promega, así como los reactivos contenidos en el kit. Este plásmido contiene extremos cohesivos con la base nitrogenada timina, por lo que los productos de PCR, a los que se les ha añadido una adenina en sus extremos, son complementarios y se puede llevar a cabo la reacción de ligación con la enzima ligasa. A continuación se muestra un diagrama del plásmido empleado:

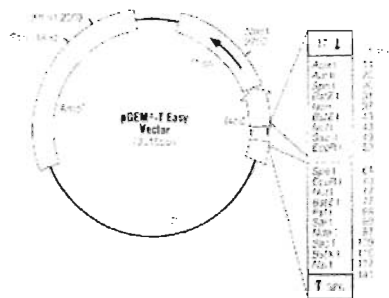


Figura 14. Plásmido pGEM®-T Easy Vector de Promega.

Se colocaron 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µL del plásmido, 1 µL de T4 DNA ligasa (3 unidades weiss/µL), y una cantidad del DNA recién obtenido a partir de PCR, utilizando para el cálculo la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector (50 ng)} \times \text{tamaño del inserto (kb)} \times 3}{\text{tamaño del vector (3.0 kb)} \times 1} = \text{ng inserto}$$

Por último se agitó para homogenizar la mezcla y se incubó una hora a temperatura ambiente.

16. Transformación de células competentes

A 2 μL de la mezcla de reacción de ligación se añadieron 50 μL de células competentes mezclando suavemente y se incubó durante 20 minutos a 4° C. Posteriormente se incubó a 42°C, después de 45-50 segundos se regresó a 4° C y se dejó durante dos minutos. Se añadieron 950 μL de medio SOC a temperatura ambiente y se incubó a 37° C durante 1.5 horas con una agitación aproximada de 150 rpm en una incubadora Lab-Line Orbit Environ-Shaker. Una vez concluida la incubación se plaquearon 100 μL en dos cajas de LB/ampicilina/IPTG/x-Gal. Las cajas se incubaron 24-36 horas y se seleccionaron las colonias de color blanco, que son las que contienen el plásmido con el inserto. Para comprobar la transformación, se extrajo el plásmido, se digirió y se realizó un gel de agarosa.

Para almacenar las células transformadas se sembraron las bacterias en LB y se incubaron a 37° C, con agitación de 200 rpm durante 14-16 horas. Se tomaron 350 μL del cultivo y se le añadieron 150 μL de una mezcla de glicerol-LB (1:1) estéril (la concentración final de glicerol es de 15%).

17. Secuenciación del DNA plasmídico

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular en un secuenciador automático AB1PRISM 310 (Perkin Elmer). La reacción de secuenciación se realizó utilizando el oligonucleótido T7 como cebador con el kit de secuenciación Big Dye Terminator Cycle (Perkin Elmer Applied Biosystem).

VII. RESULTADOS

1. Efecto de la fumonisina B1 sobre la germinación de embriones de maíz

Con la finalidad de determinar la viabilidad de los embriones de maíz y su germinación en presencia de FB1, se realizó una curva de germinación de los embriones en presencia de 0, 0.1, 1.0 y 10 μM de FB1 (Figura 15).

En la curva obtenida se observa que después de 36 horas, prácticamente el 100% de los embriones germinaron independientemente de la dosis de FB1 con que se trataron.

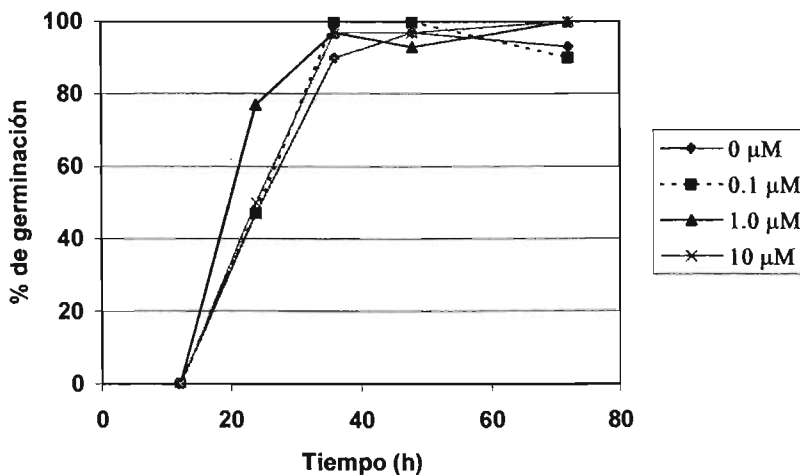


Figura 15. Efecto de la fumonisina B1 sobre la germinación de embriones de maíz. Los embriones de maíz se germinaron en presencia de distintas concentraciones de FB1 y se evaluó el porcentaje de germinación a los tiempos indicados. Se consideró un embrión germinado cuando hubo protrusión de la radícula y ésta era al menos de 2 mm de longitud.

2. Efecto de la FB1 sobre el crecimiento de la radícula y del coleoptilo en semillas de maíz

Para este ensayo se germinaron semillas de maíz completas en presencia de distintas dosis de FB1 (0, 0.1, 1.0 y 10 μM) y se determinó la longitud de la radícula y del coleoptilo.

En la figura 16 A se observa que a las 48 horas, tanto la dosis de 1 μM como la de 10 μM causaron una inhibición significativa del crecimiento radicular; sin embargo, a las 72 horas de germinación, únicamente con la dosis más alta se observó inhibición de la elongación, que fue de alrededor del 50%. Cuando se evaluó el crecimiento del coleoptilo (Fig.16 B) también se observó una inhibición significativa (35%) en la elongación a las 72 horas de germinación, con una dosis de 10 μM .

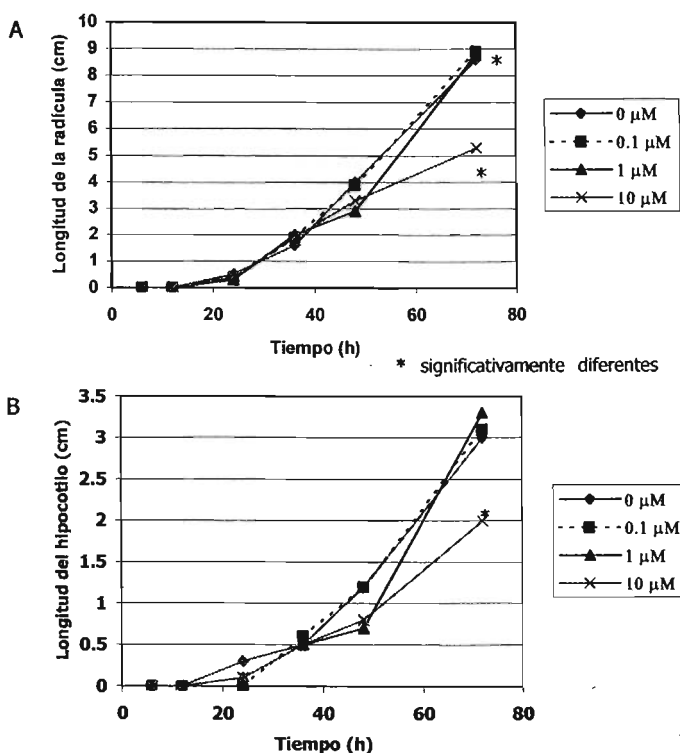
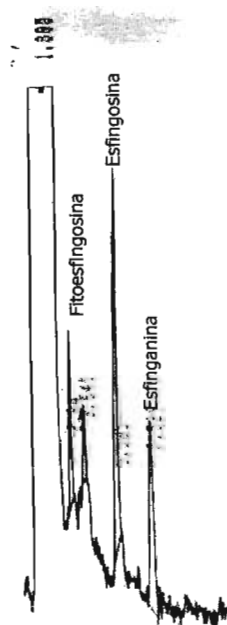


Figura 16. Inhibición del crecimiento radicular (A) y del coleoptilo (B) en semillas germinadas en presencia de diferentes dosis de FB1. Se realizaron medidas de los tejidos a los tiempos indicados ($n=30$ semillas).

Aunque la FB1 no afectó la germinación, evaluada como el porcentaje de semillas germinadas, sí alteró el crecimiento de la planta, lo que indica además que la toxina penetra los tejidos.

3. Efecto de la FB1 sobre los niveles de bases esfingoideas en embriones de semillas de maíz durante la germinación.

Se ha demostrado que la FB1 (10 μ M) produce acumulación de esfinganina y esfingosina en ejes embrionarios de maíz (Rivas San Vicente, 2001). Con el objetivo de determinar la dosis que provoca una mayor acumulación de bases esfingoideas en embriones extraídos de semillas de maíz germinadas en presencia de FB1, se realizaron extracciones de esfingolípidos a diferentes tiempos de germinación de semillas en presencia de varias dosis de FB1 y se cuantificaron por HPLC en fase reversa. En la figura 17 se observan los tiempos de retención de los diferentes esfingolípidos en el cromatograma.



Las condiciones en las que se llevó a cabo la cromatografía fueron:

Fase móvil: MeOH-Fosfatos (5mM) 89:11

Fase estacionaria: Columna C-18

Flujo: 2 mL/min

λ excitación: 337 nm

λ emisión: 448 nm

Tiempos de retención:

Fitoesfingosina: 3.6-4.2 min

Esfingosina: 5.5-6.2 min

Esfinganina: 7.8-8.2 min

Figura 17. Cromatograma que muestra los tiempos de retención de las bases esfingoideas cuantificadas. Se realizó la derivatización precolumna con OPA.

En la figura 18 se resumen los resultados obtenidos en la cuantificación de bases esfingoideas de embriones extraídos de semillas de maíz germinadas en presencia de FB1. Los datos obtenidos se detallan en el apéndice B.

En las gráficas se observa que los niveles de fitoesfingosina variaron poco durante la germinación y que las dosis más bajas de FB1 (0.1 y 1 μM) no tienen efecto sobre éstos. Solamente con la dosis de 10 μM se observó un incremento de aproximadamente 7 veces la concentración con respecto al control a las 48 horas de germinación.

En la figura 18B se observa el efecto de la FB1 sobre los niveles de esfinganina. A partir de las 48 horas de germinación en presencia de FB1 10 μM , hubo un incremento aproximado de 5 veces la concentración de este esfingolípido con respecto al control. La concentración de esfinganina decreció ligeramente a las 72 horas de germinación. Además, también se puede apreciar que una dosis de FB1 1 μM tiene efectos importantes en los niveles de esfinganina a partir de las 72 horas de germinación, ya que la concentración de esta base esfingoidea se elevó aproximadamente un 100% con respecto al control.

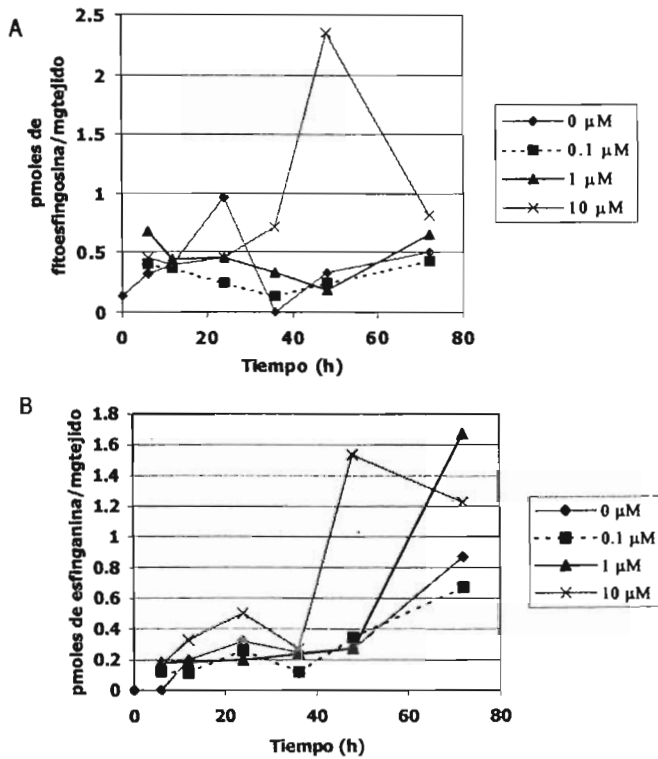


Figura 18. Niveles de fitoesfingosina (A) y esfinganina (B) en embriones de semillas germinadas en presencia de diversas dosis de FB1. Las bases esfingoideas se analizaron por HPLC de los derivados fluorescentes con α -ftaldialdehído. El análisis estadístico se muestra en el Apéndice B.

4. Efecto de la FB1 en los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz durante la germinación

La dosis de FB1 que causó la acumulación de bases esfingoideas fue 10 μM , por lo que los experimentos de determinación de los niveles de transcrito se llevaron a cabo a esa concentración de la toxina. No se logró detectar al transcrito de la HRGP en embriones de maíz, ya que su expresión en este tejido es muy baja (García Muniz *et al.*, 1998). Por tanto, fue necesario obtener los ejes embrionarios para la detección, donde el transcrito es muy abundante.

La figura 19 muestra los niveles de transcrito en ejes embrionarios germinados en ausencia y presencia de FB1 10 μM utilizando 10 μg de RNA total por carril. En la autorradiografía (A), se observan claramente dos bandas de transcrito que muestran intensidad semejante (C y D). El incremento en el nivel de expresión del mRNA de la HRGP causado por FB1 fue observable desde las 12 horas de germinación, alcanzando un máximo a las 24 horas y manteniendo niveles considerablemente elevados con respecto al control a las 48 y 72 horas de germinación. Los tamaños de los transcritos, calculados a partir de la migración de marcadores de bases de RNA son de aproximadamente 1430 y 1280 nucleótidos.

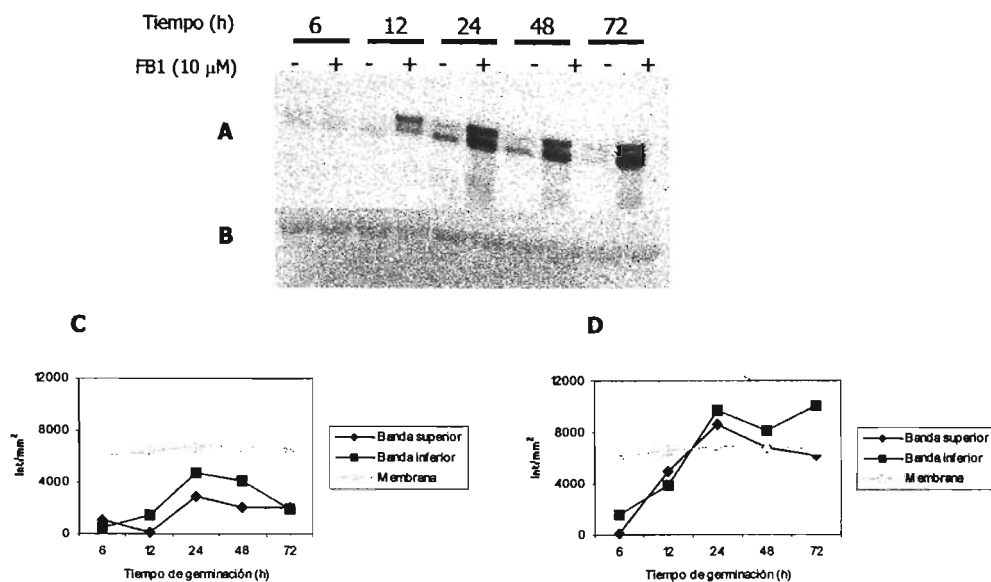


Figura 19. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a FB1 10 μ M durante la germinación. A. Autorradiografía que muestra la cantidad de transcrito de la HRGP a diferentes tiempos de germinación en ausencia (-) y presencia (+) de FB1. **B.** Membrana teñida con azul de metileno donde se muestra el corrimiento y la transferencia del RNA ribosomal de las diferentes muestras. **C.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras control. **D.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras tratadas con FB1.

5. Efecto de la esfinganina en los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz durante la germinación

Para investigar si la inducción en la transcripción del gen HRGP por la FB1 es causada por la acumulación de bases esfingoideas, se realizó un Northern Blot utilizando ejes embrionarios germinados en presencia de esfinganina 10 μM .

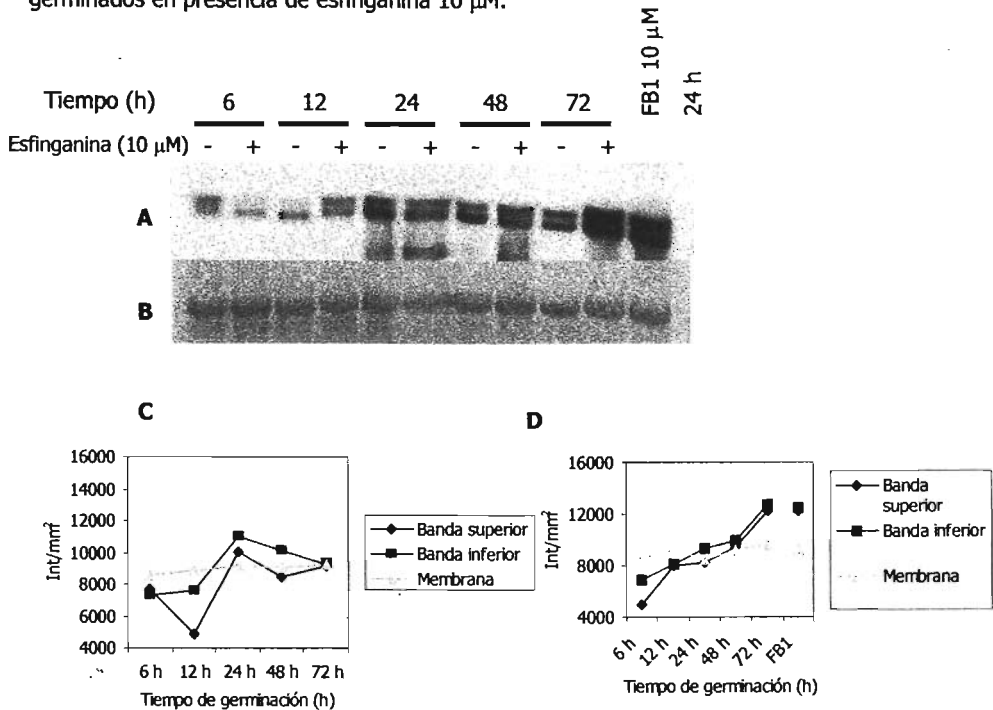


Figura 20. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a esfinganina 10 μM durante la germinación. **A.** Autorradiografía que muestra la cantidad de transcrito de la HRGP a diferentes tiempos de germinación en ausencia (-) y presencia (+) de esfinganina. **B.** Membrana teñida con azul de metileno donde se muestra el corrimiento y la transferencia del RNA ribosomal de las diferentes muestras. **C.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras control. **D.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras tratadas con esfinganina.

La autorradiografía muestra una inducción discreta de los niveles de transcrito con respecto al control durante las primeras 48 horas de germinación. El RNAm para la HRGP aumentó notoriamente a las 72 horas de germinación, alcanzando un máximo comparable al inducido por la FB1 a las 24 horas de germinación.

6. Efecto de la ceramida sobre los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz expuestos durante la germinación

Además de causar una acumulación de bases esfingoideas, la FB1 ocasiona la disminución en los niveles de esfingolípidos complejos (Merril *et al.*, 2001), los cuales contienen ceramida. Una primera aproximación para investigar si la acumulación del transcrito de la HRGP es debida al incremento en los niveles de bases esfingoideas o a la disminución de esfingolípidos complejos, fue la de germinar ejes embrionarios en presencia de ceramida 10 μ M y se realizó un northern blot para determinar los niveles de transcrito en presencia del esfingolípido.

En la autorradiografía (Fig. 21A) se observa una discreta inducción en los niveles de transcrito a las 48 de imbibición en presencia de ceramida. A pesar de que las diferencias en los niveles no son muy grandes entre las muestras tratadas con ceramida y el control, resalta el hecho de que las muestras germinadas en presencia de ceramida mostraron consistentemente un barrido debajo de los transcritos, lo que sugiere un recambio mayor en los transcritos y por tanto una mayor actividad de transcripción y degradación de los mensajes.

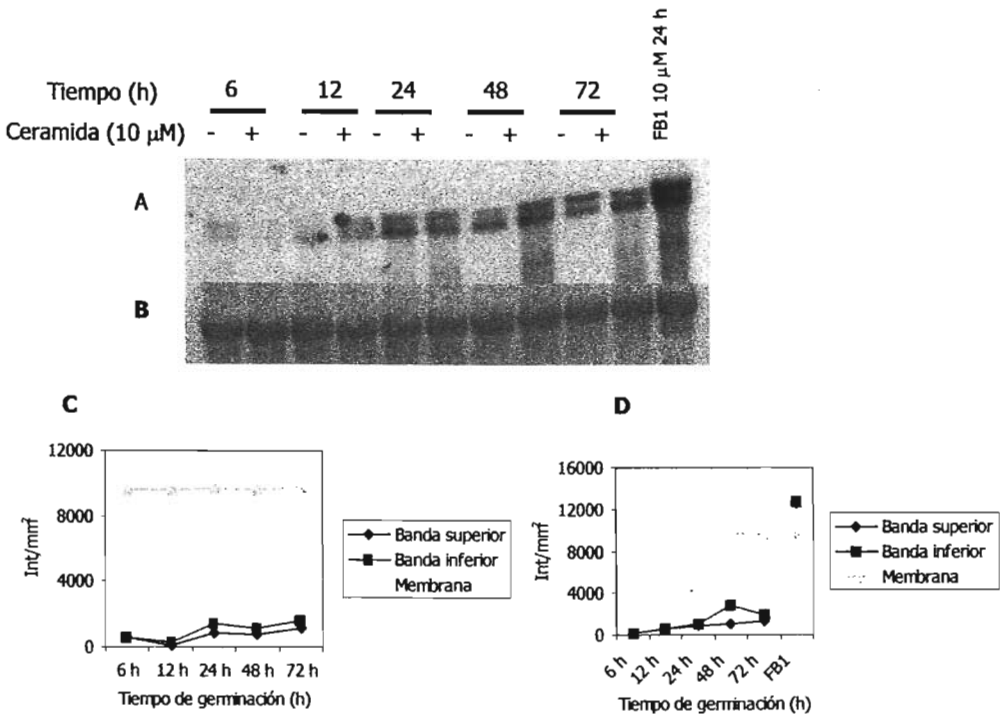


Figura 21. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a ceramida 10 μ M durante la germinación. **A.** Autorradiografía que muestra la cantidad de transcrito de la HRGP a diferentes tiempos de germinación en ausencia (-) y presencia (+) de ceramida. **B.** Membrana teñida con azul de metileno donde se muestra el corrimiento y la transferencia del RNA ribosomal de las diferentes muestras. **C.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras control. **D.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras tratadas con ceramida.

7. Efecto de inhibidores de la síntesis de bases esfingoideas en los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz durante la germinación

Para determinar si la acumulación de transcritos de la HRGP se debe a una elevación en los niveles de bases esfingoideas o a una disminución de los niveles de ceramida, se utilizaron diferentes concentraciones de dos inhibidores de la serina palmitoiltransferasa, que es la primera enzima del metabolismo de esfingolípidos.

La β -cloroalanina inhibe enzimas dependientes de piridoxal fosfato, entre las que se encuentra la SPT. Se observa que las tres concentraciones empleadas a las 24 y 36 horas de germinación produjeron una disminución en los niveles de transcrito de la HRGP, aunque no se observó un efecto de dosis pues a las 36 horas la menor concentración (0.5 mM) produjo una mayor inhibición (figura 22). En contraste, la miriocina, que es un inhibidor específico de la SPT, ocasionó un incremento notable en los niveles de expresión de la HRGP incluso en la menor dosis utilizada, que fue 10 nM (figura 23). El aumento en los niveles de transcrito causados por la miriocina es comparable o mayor al inducido por la FB1 10 μ M a las 24 horas de germinación, tiempo donde se alcanza el máximo de inducción del transcrito por la toxina.

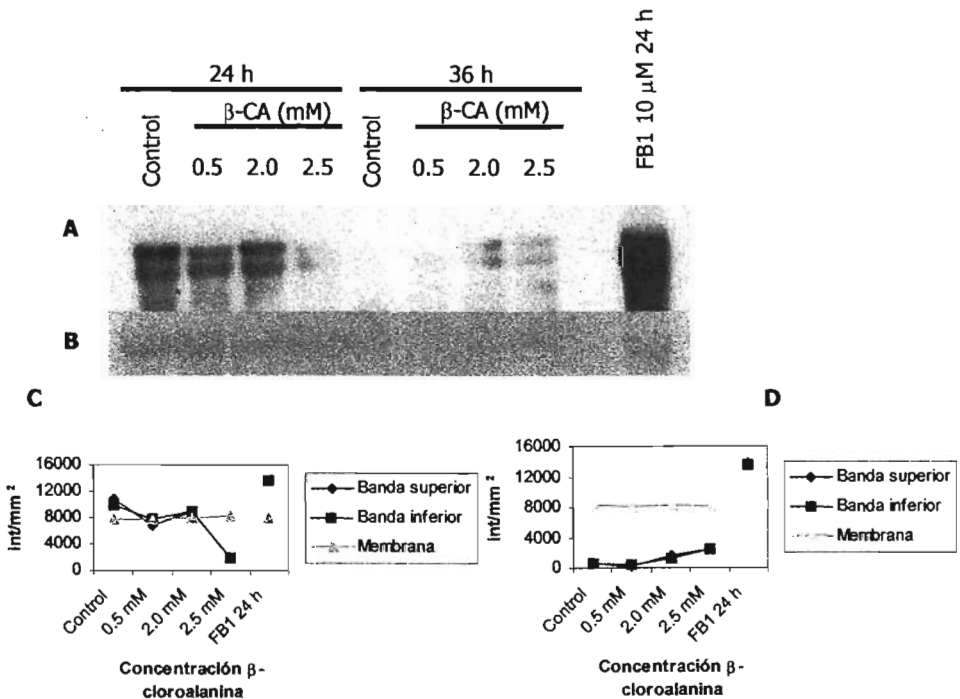


Figura 22. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a diferentes dosis de β -cloroalanina (β -CA) a las 24 y 36 horas de germinación. **A.** Autorradiografía que muestra la cantidad de transcrito de la HRGP a diferentes dosis de β -CA a las 24 y 36 horas de germinación. **B.** Membrana teñida con azul de metileno donde se muestra el corrimiento y la transferencia del RNA ribosomal de las diferentes muestras. **C.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras control y tratadas con β -CA a las 24 horas de germinación. **D.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras control y tratadas con β -CA a las 36 horas de germinación.

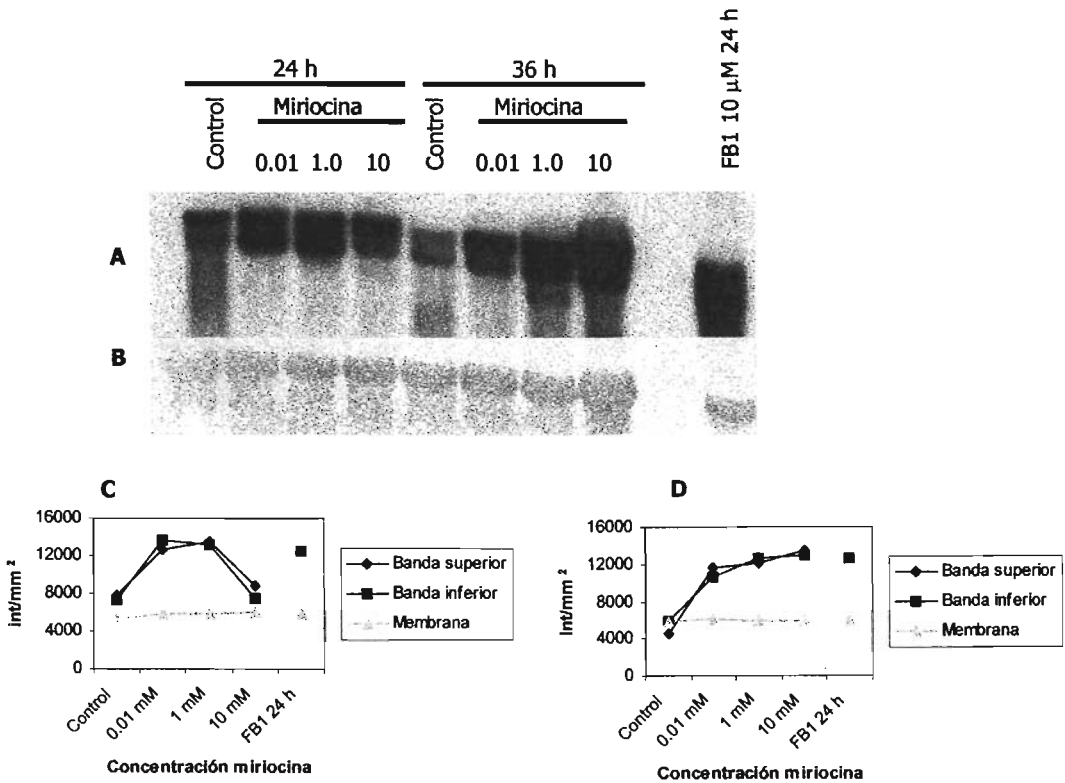


Figura 23. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a diferentes dosis de miriocina a las 24 y 36 horas de germinación. A. Autorradiografía que muestra la cantidad de transcrito de la HRGP a diferentes dosis de miriocina a las 24 y 36 horas de germinación. **B.** Membrana teñida con azul de metileno donde se muestra el corrimiento y la transferencia del RNA ribosomal de las diferentes muestras. **C.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras control y tratadas con miriocina a las 24 horas de germinación. **D.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras control y tratadas con miriocina a las 36 horas de germinación.

8. Estrategias para la determinación del origen de los transcritos de HRGP en ejes embrionarios de maíz

Debido a que se observaron dos bandas de transcrito en las autorradiografías, se realizaron experimentos para determinar el origen de las señales detectadas. Las estrategias se encaminaron a la detección del número de copias del gen y a estudiar la posibilidad de procesamiento alternativo del mensajero, ya que éste posee un intrón en el extremo 3' UTR, de aproximadamente 150 nucleótidos, similar a la diferencia de tamaños observada de ambos transcritos.

8.1 Southern Blot

Debido a que en la literatura no se reporta inequívocamente el número de copias de este gen en el genoma de maíz, esto se investigó utilizando la técnica de Southern Blot. Se empleó la misma sonda que para detectar los transcritos en el Northern Blot y a pesar de realizar un gran número de experimentos en los que se probaron distintos protocolos de extracción de DNA genómico de diversos tejidos, y de realización del Southern Blot, no se pudo detectar la señal correspondiente.

8.2 Búsqueda de la secuencia del intrón en un banco de EST (Expressed Sequenced Tags) en un banco de maíz

Para investigar si el transcrito más largo corresponde a mRNA no procesado se hizo una búsqueda de la secuencia del intrón en un banco de secuencias de cDNAs provenientes de una colección de bibliotecas (<http://www.maizegdb.org/> consultada en Noviembre de 2004). En este banco se encontraron secuencias EST que contienen la secuencia del transcrito maduro y solamente una secuencia de cDNA que contiene el intrón. Esta secuencia (EST CF349276; GenBank: 33942676) tiene una alta similitud con el gen de la HRGP que contiene el intrón en la región 3' UTR; el cDNA proviene de una biblioteca hecha a partir de RNAm de saco embrionario de maíz, que representa una etapa temprana en el desarrollo de la semilla. Este análisis sugiere que en otras etapas de desarrollo podrían detectarse productos de procesamiento alternativo.

1							60
EST		CA	CCCCCAGCCC	GCCGCCACCT	TACTACTAGA	AAGCGATGCC	
HRGP	GACGCCGCCG	GTGTCTCACA	CCCCCAGCCC	GCCGCCACCA	TACTACTAGA	AAGCGATGCC	
ConsensusCA	CCCCCAGCCC	GCCGCCACCa	TACTACTAGA	AAGCGATGCC	
	61						120
EST	TACCA-----	CACTGCTGTC	AGTCTCTGGA	GCATTTAGGT	ACGTACTAGT	ACTACGTATA	
HRGP	TACCATACCA	CACTGCTGTC	AGTCTCTGGA	GCATTTAGGT	ACGTACTAGT	ACTACGTATA	
Consensus	TACCA.....	CACTGCTGTC	AGTCTCTGGA	GCATTTAGGT	ACGTACTAGT	ACTACGTATA	
	121						180
EST	CGTACAAGAA	TGGAGCATGC	AATGTGCATG	CACACTGCAT	ACATTTAGTA	TGT-----	
HRGP	CGTACAAGAA	TGGAGCATGC	AATGTGCATG	CACACTGCAT	ACATTTAGTA	TGTGCTTGTG	
Consensus	CGTACAAGAA	TGGAGCATGC	AATGTGCATG	CACACTGCAT	ACATTTAGTA	TGT.....	
	181						240
EST	-CAAATGTAT	CGTCAGTATC	ATACTGATCT	CCTGGCATAG	TCTGGCACTA	ACCATAGGCT	
HRGP	TCAAATGTAT	CGTCAGTATC	ATACTGATCT	CCTGGCATAG	TCTGGCACTA	ACCATAGGCT	
Consensus	.CAAATGTAT	CGTCAGTATC	ATACTGATCT	CCTGGCATAG	TCTGGCACTA	ACCATAGGCT	
	241						300
EST	CTCCTTTTCT	TTTGTGTTGG	ACAGGTGGTC	TCGATCAATG	GAAGGGTTGT	GTCCTAGCCA	
HRGP	CTCCTTTTCT	TTTGTGTTGG	ACAGGTGGTC	TGGATCAATG	GAAGGGTTGT	GTCCTAGCCA	
Consensus	CTCCTTTTCT	TTTGTGTTGG	ACAGGTGGTC	TcGATCAATG	GAAGGGTTGT	GTCCTAGCCA	
	301						360
EST	GCCGGCAAAG	ATGAGCTGCT	GATGGTAATG	ATGATGATAA	GAGGCCACTG	CTACCCTACT	
HRGP	GCCGGCAAAG	ATGAGCTGCT	GATGGTAATG	ATGATGATAA	GAGACCCTG	CTAC-----	
Consensus	GCCGGCAAAG	ATGAGCTGCT	GATGGTAATG	ATGATGATAA	GAGACCCTG	CTAC.....	

Figura 24. Alineación de la secuencia EST CF349276 con la secuencia genómica de la HRGP. En verde se denota el alineamiento correspondiente al intrón.

8.3 Utilización de una sonda específica para el 3'UTR

Debido a que la región 3' UTR de genes parálogos muestra una mayor variabilidad que la región codificante, se sintetizó una sonda basada en la secuencia 3' UTR del gen de la HRGP reportado, y se empleó en Northern Blot para determinar a cuál transcrito correspondía. El patrón obtenido (fig. 25) fue idéntico al observado con la sonda de la región codificante del gen (fig. 19), pues se observó el doblete, lo que sugiere que ambos transcritos provienen del mismo gen.

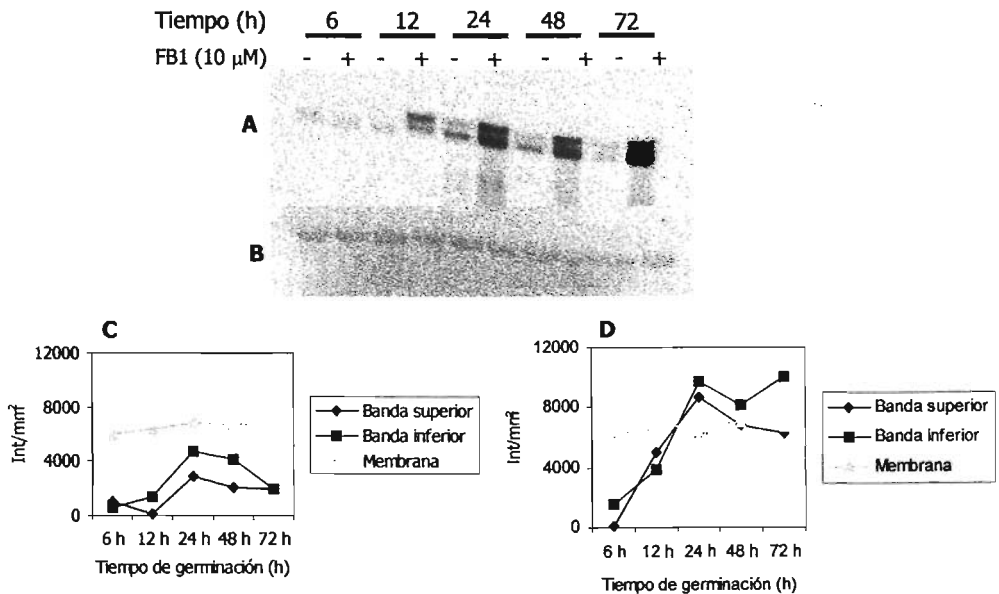


Figura 25. Niveles de transcrito de la HRGP de ejes embrionarios de maíz expuestos a FB1 10 μ M durante la germinación utilizando una sonda específica para el extremo 3' UTR. A. Autorradiografía que muestra ambas bandas de transcrito de HRGP. **B.** Membrana teñida con azul de metileno donde se muestra el corrimiento y la transferencia del RNA ribosomal de las diferentes muestras. **C.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras control. **D.** Análisis densitométrico de las bandas del transcrito y del RNAr 18 S para las muestras tratadas con FB1.

8.4 Diseño de oligonucleótidos que amplifican la secuencia del intrón

Debido a que los resultados obtenidos con la sonda específica para 3'UTR sugieren un origen común para los transcritos y a que se ha reportado por lo menos un cDNA que contiene el intrón, se analizó la posibilidad de que ambos transcritos se generaran por un proceso de splicing alternativo. Como ya se mencionó, el gen de la HRGP posee un único intrón de 165 pb en su extremo 3'UTR y este tamaño es similar a la diferencia en el tamaño de los transcritos (~ 1430 y ~ 1280 bases). Existe evidencia que sugiere que la presencia de intrones puede afectar la transcripción de diversos genes. Un ejemplo es el gen *r1* involucrado en la síntesis de antocianinas en maíz; cuando no se remueven los intrones presentes en el 5'UTR y en la región codificante de este gen, la transcripción se incrementa (Procissi, *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* este fenómeno se conoce como IME (Intron-Mediated-Enhancement) y se cree que funciona a nivel co- o post-transcripcional, aunque el mecanismo aún no es claro (Rose, 2002). Para explorar la posibilidad de un procesamiento alternativo, se diseñaron varios oligonucleótidos, cuya posición relativa y orientación se muestran en la figura 26.

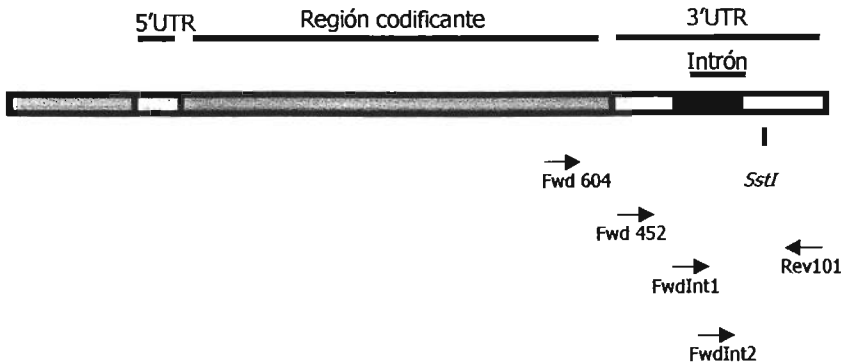


Figura 26. Esquema de la estructura del gen de la HRGP y diseño de los oligonucleótidos.

Se realizaron ensayos de RT-PCR con las muestras de RNA que contienen mayores niveles del transcrito del gen HRGP (FB1, 24 h). Los productos obtenidos se analizaron y purificaron en geles de agarosa y se clonaron en el vector pGEM, que se utilizó para transformar *E.coli*, cepa DH5 α .

Se utilizó RNA como molde, sin transcriptasa reversa como control. Con los oligonucleótidos Fwd452 y Rev101, se obtuvieron dos fragmentos de DNA, una banda apenas visible de aproximadamente 450 pb y otra de 300 pb (Fig. 27 carril 1 y fig. 28 A). Sin embargo, cuando se donó la banda de 450 pb, se obtuvo un producto de 220 pb al digerir el plásmido (Fig. 28 C). También se incluyó un control positivo de DNA genómico como molde, del cual se amplificó un producto de 450 pb a partir de DNA genómico (fig. 27 carril 3 y fig. 28 B). En la región 3'UTR hay un sitio de corte (gagctc) para la enzima *Sst*I (I), por lo que se realizaron digestiones con los 3 productos (los productos de 220 pb y de 300 pb obtenidos con cDNA y el producto de 450 pb obtenido con DNA genómico), obteniéndose fragmentos de 361 pb y 196 pb para el producto amplificado a partir de DNA genómico y el producto de 300 pb a partir de cDNA, pero no para el de 220 pb (fig. 28 D).

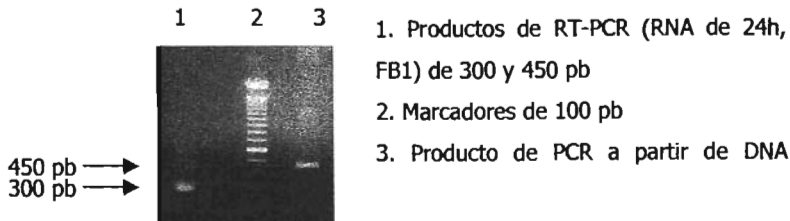


Figura 27. Fragmentos de DNA obtenidos a partir de RT-PCR usando RNA de ejes embrionarios germinados en presencia de FB1 10 μ M con los cebadores Fwd452 y Rev101.

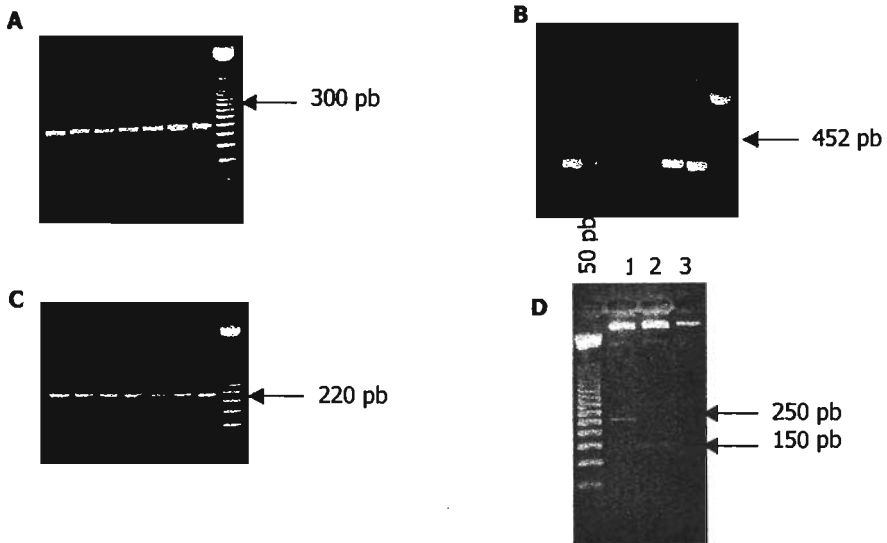


Figura 28. Digestión de DNA de plásmidos en los que se donaron los productos de RT-PCR amplificados con los oligos Fwd452-Rev101. A. Digestión con *EcoRI* del plásmido en el que se donó el fragmento de 300 pb, proveniente de RT-PCR, usando RNA_T de 24 horas como molde. **B.** Digestión con *EcoRI* del plásmido en el que se donó el fragmento de 450 pb proveniente de PCR utilizando DNA genómico como molde. **C.** Digestión con *EcoRI* del plásmido en el que se donó el fragmento de 450 pb proveniente de RT-PCR utilizando RNA_T de 24 horas como molde. **D.** Digestión con *SstI* de plásmidos en los que se donaron fragmentos de 452 pb (DNA genómico, carril 1), de 300 pb (RT-PCR, carril 2) y de 450 pb (RT-PCR, carril 3).

Los resultados obtenidos no aportaron evidencia sobre un posible procesamiento alternativo, ya que no se logró aislar una secuencia proveniente de cDNA que contuviera el intrón. Estos resultados apuntan a la presencia de una población única de transcritos de este gen. Sin embargo, se intentó realizar amplificación de productos usando distintos cebadores sentido (Fwd604-Rev101, FwdInt1-Rev101, FwdInt2-Rev101) con el mismo cebador antisentido. El resumen de estos resultados se presenta en la tabla 5.

Tabla 4. Resumen de resultados obtenidos con los diversos cebadores

Combinación de primers	RNA	DNA
Fwd604-Rev101	No hubo amplificación	No hubo amplificación
Fwd452-Rev101	300 pb/220 pb	450 pb
FwdInt1-Rev101	No hubo amplificación	420 pb
FwdInt2-Rev101	280 pb	280 pb

Cuando se empleó el primer Fwd604 no se obtuvieron productos de amplificación con DNA ni con RNA. La secuencia de este oligonucleótido se encuentra en la región codificante, la proteína tiene un alto contenido de prolinas, cuyos codones son CCC,CCG, CCU y CCA, por lo que la secuencia del gen es rica en G + C. Estas secuencias son difíciles de amplificar debido a la estabilidad de la unión por puentes de hidrógeno entre guanina y citosina.

La existencia de una sola población de transcritos se apoyó también por el hecho de que no se obtuvieron productos de amplificación a partir de RNA_{total} cuando se usó la combinación FwdInt1-Rev101, cuya secuencia se diseñó a partir del intrón de la *ZmHRGP*. El control positivo al usar DNA genómico generó un producto del tamaño esperado de 420 pb. El oligonucleótido FwdInt2 contiene 11 nucleótidos en su extremo 3' correspondientes al exón 2 y el resto correspondientes al intrón (Fig. 31) y cuando se empleó, generó un producto de amplificación de 280 pb tanto con RNA como con DNA (Fig. 32). Sin embargo, esto no constituye evidencia de que se tenga una población de transcritos sin procesar, pues es posible que el cebador se hubiese alineado al cDNA a través de las 11 pb en que sí hay complementariedad. La secuencia nucleotídica del producto efectivamente corresponde a la *ZmHRGP* (Fig. 33).

8.5 Secuenciación de los diferentes insertos obtenidos:

Con el fin de confirmar la identidad de los productos amplificados, se obtuvo su secuencia nucleotídica. Al realizar una comparación con las secuencias reportadas por medio del programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) se encontró que los fragmentos corresponden a la HRGP de maíz reportada por Stiefel y colaboradores (1988); ninguna de las clonas obtenidas a partir de RNA por RT-PCR contenía el intrón. La clona de 220 pb no se secuenció por carecer de un sitio de corte para *SstI*. Únicamente la clona obtenida a partir de DNA genómico de maíz contenía el intrón.

8.6 Alineamiento para el fragmento de 300 pb (RT300—T7)

En la figura 29 se muestra el alineamiento del fragmento obtenido por RT-PCR de 300 pb con una secuencia de mRNA de HRGP de maíz reportada por Stiefel y colaboradores en 1988. Identidad=98%

```

Frag.: 20  ctgcgttattctctcctcgcgatcgtctaacggggacggatggcagcacacaagaggagg 79
          |||
HRGP : 536 ctgcgttattctctcctcgcgatcgtctaacggggacggatggcagcacacaagaggagg 477

Frag.: 80  tacgtagtaggtagcagtgccctcttatcatcatcattaccatcagcagctcatctttg 139
          |||
HRGP : 476 tacgtagtaggtagcagtgccctcttatcatcatcattaccatcagcagct-atctttg 418

Frag.: 140 ccggtggctaggacacaactcttcattgatccagaccacctaaatgctccagagactg 199
          |||
HRGP : 417 ccggtggctaggacacaactcttcattgatccagaccacctaaatgctccatatactg 358

Frag.: 200 acagcagtgtggtatggtagg 220
          |||
HRGP : 357 acagcagtgtggtatggtagg 337

```

Figura 29. Alineamiento para el fragmento de 300 pb obtenido a partir de RT-PCR.

8.7 Alineamiento de la secuencia obtenida de DNA genómico (GEN450-T7)

En la figura 30 se observa que el fragmento obtenido a partir de DNA genómico de maíz presentó una identidad del 95% con respecto al gen reportado para la HRGP de maíz. En negritas se marca la secuencia del intrón.

```

Frag.: 1      cctaccataccacactgctgtcagtcctctggagcatttaggtacgtactagtagtactacgta 60
|||||
HRGP : 3179  cctaccataccacactgctgtcagtcctctggagcatttaggtacgtactagtagtactacgta 3238

Frag.: 61      tacgtacaagaatggagcatgcaatgtgcatgcacactgcatacatttagtatgtgcttg 120
|||||
HRGP : 3239  tacgtacaagaatggagcatgcaatgtgcatgcacactgcatacatttagtatgtgcttg 3298

Frag.: 121     tgtccaatgtatcgtcagtatcactgatctcctggcatagtcctggcactaacoatagg 180
|||||
HRGP : 3299  tgtccaatgtatcgtcagtatcactgatctcctggcatagtcctggcactaacoatagg 3358

Frag.: 181     ctctcctttcttttggttggacaggtggtctggatcaatggaaggttgtgtcctagc 240
|||||
HRGP : 3359  ctctcctttcttttggttggacaggtggtctggatcaatggaaggttgtgtcctagc 3418

Frag : 241     cagccggcaaagatgacgtgctgatggtaatgatgatgataagaggccactgctacccta 300
|||||
HRGP : 3419  cagccggcaaagatgacgtgctgatggtaatgatgatgataagagaccactg----- 3470

Frag.: 301     ctacgtaccctcct-ctttgtgtgctgccatccgtccccgtagacgatcgaggagagaa 359
|||||
HRGP : 3471  ctacgtaccctcctcctttgtgtggtgccatccgtccccgtagacgatcgaggagagaa 3530

Frag.: 360     taacgcagagctctctgctcccggc--ctgtcttctgccgtcccggccgtttaatttact 417
||
HRGP : 3531  ta--gcagagctctgtgctcccggcctctgtcttct-ccgtcccggccgtttaatttact 3587

Frag.: 418     agtgtgttcgt-cctatatgttttagcagcagcaggtgtattgt 459
|||||
HRGP : 3588  agtgtgttcgtccctatatgttttagcagcagcaggtgtattgt 3630

```

Figura 30. Alineamiento de la secuencia obtenida a partir de DNA genómico de maíz.

```

3121 gacgccgccc gtgtctcaca cccccagccc gccgccacca tactactaga aagcgatgcc
3181 taccatacca cactgctgtc agtctctgga gcatttaggt acgtactagt actaogtata
3241 cgtacaagaa tggagcatgc aatgtgatg cacactgcat acatttagta tgtgcttgtg
3301 tcaaatgtat cgtcagtatc aactgtatct cctggcatag tctggcacta accataggct
3361 ctccttttct tttgtgttgg acaggtggtc tggatcaatg gaagggttgt gtcctagcca
3421 gccggcaaag atgagctgct gatggaatg atgatgataa gagaccactg ctacgtaccc
3481 tcctcctttg tgtggtgcc a ccgtccccg ctagacgatac gaggagagaa tagcagagct
3541 ctgtgctccc ggctctgtc ttctccgtcc cggccgttta attactagt gtgttcgtcc
3601 ctatatgttt agcagcagca ggtgtattgt gccgggatgt aatggtattg

```

Figura 31. Fragmento del extremo 3'UTR del gen HRGP. El intrón se encuentra resaltado en negritas. Los oligonucleótidos diseñados están subrayados. Se puede observar que el primer oligonucleótido (Fwdint1) se encuentra al inicio del intrón (producto esperado de 420 pb), mientras que el segundo oligonucleótido (Fwdint2) está al final del intrón e incluso abarca bases que no pertenecen a éste (producto esperado 280 pb).

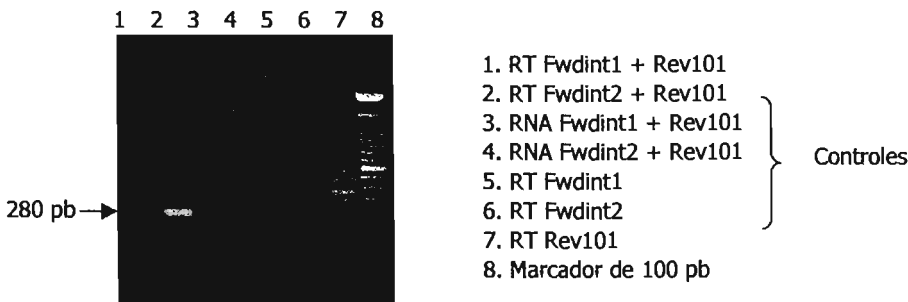


Figura 32. RT-PCR utilizando los oligonucleótidos Fwdint1 y Fwdint2 con el cebador Rev101. RT se refiere al producto de transcripción reversa a partir de mRNA de ejes embrionarios de maíz germinados 24 horas en presencia de FB1 10 μ M. Como controles se utilizaron RNA sin transcripción reversa, para analizar que no hubiera contaminación con DNA genómico y se utilizó el producto de la reacción de RT con cada uno de los oligonucleótidos.

La banda de 280 pb se clonó en *E. coli* DH5 α y se secuenció. Se obtuvo una identidad del 95% con el gen de la HRGP de maíz.

```

Frag.: 5   tgtggacaggtggtctggatcaatggaagagttgtgtcctagccagccgcaaagatga 64
          |||
HRGP : 3375 tgtggacaggtggtctggatcaatggaagggttgtgtcctagccagccgcaaagatga 3434

Frag.: 65   gctgctgatggtaatgatgatgataagaggcactgctaccctactacgtaccctcctcc 124
          |||
HRGP : 3435 gctgctgatggtaatgatgatgataagagaccactgctac-----gtaccctcctcc 3486

Frag.: 125  tt-gtgtgctgccatccgtccccggttagacgatcgaggagagaataacgcagagctctct 183
          ||
HRGP : 3487 tttgtgtggtgccatccgtccccgctagacgatcgaggagagaata--gcagagctctgt 3544

Frag.: 184   gctccccgc--ctgtcttcagccgtcccggcgtttaattactagtgtgttcgt-ccta 240
          |||
HRGP : 3545 gctccccgcctctgtcttc-tccgtcccggcgtttaattactagtgtgttcgtcccta 3603

Frag.: 241   tatgttagcagcagcaggtgtattgt 267
          |||
HRGP : 3604 tatgttagcagcagcaggtgtattgt 3630

```

Figura 33. Alineamiento de la secuencia obtenida para Fwdint2 y Rev101. La parte que comprende al intrón se muestra en negritas y el oligonucleótido Fwdint2 se encuentra subrayado.

VIII. DISCUSIÓN

La FB1 es una micotoxina con estructura esfingoidea que produce gran variedad de efectos en diversos sistemas. Muchos de éstos son causados probablemente por el incremento en los niveles de bases esfingoideas y la disminución de esfingolípidos complejos, ya que esta toxina inhibe a la esfinganina *N*-aciltransferasa con una alta afinidad (Merril *et al.*, 2001). Tanto las bases esfingoideas como los esfingolípidos complejos tienen suma importancia en cascadas de señalización que regulan eventos de proliferación celular, diferenciación celular o apoptosis, por lo que el balance en las concentraciones de los distintos esfingolípidos es crucial para determinar el destino de la célula (Pyne y Pyne, 2000).

En maíz, la FB1 induce la acumulación de bases esfingoideas (Rivas San Vicente, 2001), inhibe la elongación radicular y la actividad de una α -amilasa (Doehlert *et al.*, 1994), induce la activación de nucleasas (De la Torre, comunicación personal), la transcripción de genes de defensa (San Juan Badillo, 2000) y altera la permeabilidad membranal (Gutiérrez Nájera, 1999). Es posible que por lo menos algunos de los efectos causados por la fumonisina B1 en maíz se deban a un incremento en los niveles de bases esfingoideas o bien, a una disminución en los niveles de esfingolípidos complejos.

1. Efecto de la FB1 sobre la germinación de embriones de maíz y sobre el crecimiento de la radícula y del coleoptilo en semillas de maíz

Para analizar la viabilidad de las semillas, así como su susceptibilidad a la FB1, se realizó una curva de germinación exponiendo las semillas a 0.1, 1.0 y 10 μ M de toxina. Los resultados indican que la germinación no se inhibe por la FB1, ya que las semillas mostraron tasas de germinación similares y alcanzaron un porcentaje de germinación cercano al 100% para todas las dosis. Estudios con maíz y otras especies, como *A. thaliana* han demostrado que la toma de agua y la germinación ocurren aun en presencia de inhibidores de la transcripción como la α -amanitina, lo que sugiere que los RNAm almacenados son suficientes para el desarrollo de la plántula en etapas tempranas. En contraste, la síntesis *de novo* de proteínas sí es indispensable para la germinación pues el inhibidor cicloheximida previene la germinación de semillas de *A. thaliana* (Rajjou *et al.*, 2004). Estas etapas iniciales no fueron afectadas por la

FB1 pues no se observaron diferencias en la protrusión de la radícula a ninguna dosis. Sin embargo, sí se observó un efecto significativo de la toxina (10 μ M) en el crecimiento posterior de la radícula y del coleoptilo. Esta inhibición puede ser explicada por distintos mecanismos que no son excluyentes y que pueden depender tanto de la alteración del metabolismo de esfingolípidos, como de la acción directa de la toxina sobre otros blancos celulares.

La FB1 es un inhibidor acompetitivo de la ATPasa de protones de membrana plasmática y reduce la acidificación del medio, lo que dificultaría el proceso de elongación (Gutiérrez-Nájera et al., 2005, En prensa). Es posible que la disminución en la elongación radicular observada en semillas germinadas en presencia de FB1 se deba, al menos en parte, a la inhibición de esta enzima, de la que dependen varios procesos fisiológicos tales como la nutrición, elongación y homeostasis iónica de las células. Asimismo, se ha reportado también que la FB1 inhibe al menos una actividad de α -amilasa, otra enzima cuya función es relevante en la germinación y desarrollo posterior (Dohelert, et al., 1994).

Por otro lado, la FB1 altera la permeabilidad de la membrana y, debido a que inhibe la síntesis de esfingolípidos, causa alteraciones en la composición lipídica de la membrana. Se ha demostrado que la composición de lípidos en la membrana puede afectar la germinación, ya que en *A. thaliana* se han encontrado mutantes defectuosas en la síntesis de esteroides que presentan expansión celular reducida durante la germinación, división celular descontrolada y pelos radiculares excesivos. A los tres días de germinación, el crecimiento radicular de estas mutantes se reduce considerablemente con respecto al control. La elongación radicular en estas plantas cesa a los 15-18 días después de la germinación. Un efecto importante de la alteración en el perfil de esteroides en estas mutantes es la desregulación de la vía de señalización por etileno. En *A. thaliana* el etileno controla la división y la organización celular. La presencia de balsas lipídicas en plantas no está completamente demostrada, pero existen cada vez más datos que indican que existen vías de señalización específicas cuya localización o función dependen de la composición de esteroides membranales (Souter et al., 2004). Otro componente importante de estos dominios de lípidos en plantas, por lo menos en *A. thaliana*, son los esfingolípidos (Borner et al., 2005) por lo que, si existen alteraciones en estos lípidos causadas por la FB1, varias vías de señalización, así como algunas ATPasas, y otras proteínas podrían verse afectadas.

Una alternativa para explicar la inhibición de la elongación radicular en semillas germinadas en presencia de FB1 es su efecto sobre los niveles de arabinogalactoproteínas (AGPs) ancladas

a la superficie celular por un residuo de glicosilfosfatidil inositol (GPI). En levadura se ha observado que la inhibición de la síntesis de ceramida por miriocina conduce a una reducción rápida y específica del transporte de proteínas GPI del retículo endoplásmico al aparato de Golgi (Horvath *et al.*, 1994). Las AGPs son proteoglicanos cuyo esqueleto peptídico es rico en prolina/ hidroxiprolina, alanina, serina y treonina y los residuos de hidroxiprolina están generalmente unidos a cadenas de carbohidratos de arabino galactanos tipo II (Schultz *et al.*, 1998). Muchas proteínas AGP contienen en el extremo C-terminal un ancla de glicosil fosfatidil inositol cuyo esqueleto glicano es trimanosil glucosamina unido a diacilglicerol, o bien a ceramida. Esta ancla GPI genera un mecanismo alternativo para que la proteína se inserte en membranas celulares (Schultz *et al.*, 1998).

La expresión de las AGPs en plantas es específica de tejido y se ha sugerido que tienen una función en la expansión de células de la raíz pues cuando se tratan raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* con el reactivo de Yariv (β -D-Glc)₃ que se une a los residuos de arabinosa de las AGPs, se inhibe el crecimiento radicular y se observa un abultamiento de las células epidermales (Ding y Zhu, 1997). Además de estas evidencias farmacológicas sobre la función de las proteínas AGP en el crecimiento vegetal, se han caracterizado algunas mutantes en *A. thaliana* de estas proteínas que tienen un fenotipo característico. En las mutantes *seth1* y *seth2* está bloqueada la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico, efecto que se asocia con una deposición anormal de calosa. Los genes SETH1 y SETH2 codifican proteínas conservadas que están involucradas en el primer paso de la ruta biosintética de GPI (Lalane *et al.*, 2004).

Cobra es otra mutante de *A. thaliana* que está afectada en la orientación de la expansión celular de la raíz y en los niveles de celulosa cristalina de la pared celular de la zona de crecimiento. La secuencia del gen predice un sitio de anclaje para GPI y las evidencias sugieren que está involucrado en la síntesis de celulosa (Schindelman *et al.*, 2001). En maíz se identificó un gen con 40% de similitud a *AtCobra1*, cuyo transcrito se expresa en etapas tempranas de germinación, pero no en otros tejidos como hojas. Este gen es uno de los pocos genes caracterizados cuya expresión es específica de la germinación y se ha propuesto que la proteína codificada participa en la regulación de la expansión celular (Cruz-García *et al.*, 2003). Sería interesante determinar si esta proteína es efectivamente modificada por GPI, como predice su secuencia y si esta modificación y la función de la proteína depende de la síntesis *de novo* de esfingolípidos. Aunque el requerimiento de la biosíntesis *de novo* de ceramida para

el transporte del retículo endoplásmico al aparato de Golgi de proteínas GPI se ha propuesto en levadura (Skrzypek *et al.*, 1997), distintos investigadores han demostrado que la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos en plantas por la acción de la fumonisina B1 podría tener un efecto similar al de la inhibición de la biosíntesis de la ceramida. Se han propuesto varias hipótesis sobre la función de la ceramida en este tipo de transporte y que no son excluyentes entre sí. Una posibilidad del requerimiento de ceramida es como un componente de las membranas para la asociación estable del ancla GPI con la membrana por interacciones hidrofóbicas. Otra posibilidad es que la ceramida participe en la formación de balsas lipídicas en el RE pues se ha demostrado que este esfingolípido promueve la formación de microdominios *in vitro*. También es posible, tanto en levaduras como en plantas, que la ceramida funcione como sustrato para modificar el residuo lipídico del GPI en el retículo endoplásmico (Watanabe *et al.*, 2002). En resumen, tanto la FB1 como la miriocina podrían ser empleadas para determinar el papel de la ceramida en la arquitectura radicular y posiblemente en la función de las proteínas GPI durante esta etapa del desarrollo en plantas.

Los esfingolípidos complejos, como la inositol fosforil ceramida (IPC), también son relevantes en mantener la polaridad celular del crecimiento en el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*, pues la inhibición de la IPC sintasa con aureobasidina previene el crecimiento durante la germinación de las esporas; la ceramida que se acumula ocasiona una detención en el ciclo celular en la fase G1 (Cheng *et al.*, 2001).

Una estrategia para determinar si la acción de la FB1 sobre las semillas de maíz en germinación fue mediada por la acumulación de bases esfingoideas, o bien por la disminución en los niveles de esfingolípidos, fue realizar experimentos con bases esfingoideas, ceramida y miriocina, un inhibidor de la serina palmitoil transferasa.

2. Efecto de la FB1 sobre los niveles de bases esfingoideas en embriones de semillas de maíz durante la germinación

La acumulación de bases esfingoideas causada por la FB1 es un fenómeno descrito para diversos sistemas, tanto vegetales como animales (Merrill, 1997). Los niveles de esfinganina aumentaron durante la germinación y elongación de las semillas control. Es posible que la reactivación del metabolismo causada por la rehidratación conduzca a un mayor requerimiento de esfingolípidos complejos, y por ello se detecte un incremento en la concentración de

intermediarios de la ruta metabólica. En el caso de los embriones de maíz de semillas germinadas en presencia de FB1, se observó acumulación de esfinganina 5 veces mayor que el control a las 48 horas de germinación a una dosis de 10 μM , aunque dosis menores (1 μM) logran un efecto similar a tiempos más avanzados de la imbibición (72 h). Este resultado implica que aún a las 72 horas de imbibición la FB1 sigue siendo activa. La esfinganina es el sustrato de la enzima esfinganina-*N*-aciltransferasa, por lo que el inhibidor competitivo causa la acumulación de esta base (Lynch, 1999).

Los niveles de fitoesfingosina también fueron afectados por la presencia de la toxina, teniendo un máximo de acumulación de aproximadamente 5 veces con respecto al control a las 48 h de germinación con una dosis de 10 μM de FB1. No se sabe con certeza la causa de la acumulación de fitoesfingosina ocasionada por la FB1, ya que esta base no es el sustrato directo de la enzima inhibida. Existen varias hipótesis que explican las posibles razones por las que la fitoesfingosina se acumula en las células: a) en *Saccharomyces cerevisiae* existe una ruta metabólica en la que la fitoesfingosina es el precursor de la ceramida, por lo que existe la posibilidad de que esta vía se encuentre también en plantas (Dickson, 1998); b) es probable que la célula tenga un mecanismo de desintoxicación de esfinganina por medio de su hidroxilación a fitoesfingosina, disminuyendo de esta manera la acumulación de esfinganina; c) el residuo de esfinganina es hidroxilado una vez que se ha unido al ácido graso para formar la ceramida, por lo que es posible que la fitoesfingosina provenga de la vía de degradación de esfingolípidos complejos (Merrill *et al.*, 1996). En este mismo sentido, el exceso de esfinganina se puede reducir por fosforilación por una esfinganina cinasa, cuya actividad también se ha reportado en maíz.

En las semillas tratadas con FB1 10 μM se observa una disminución en la acumulación de fitoesfingosina y esfinganina a las 72 h de germinación. Es poco probable que este efecto se deba a la degradación de la FB1 en el medio de germinación por dos razones a) a las 72 horas se observa un efecto de acumulación con la dosis de 1 μM de FB1 y b) la FB1 se degrada por esterases en un derivado aun más tóxico que la FB1 llamado aminopentol (Merrill *et al.*, 2001). Se ha postulado que la fosforilación de bases esfingoideas por la enzima esfingosina cinasa es un mecanismo de desintoxicación de las células. De hecho, las células HEK-293 (de riñón embrionario humano), pierden su resistencia natural a la FB1 cuando se les aplican inhibidores de la esfingosina cinasa (Sharma *et al.*, 2004). Es muy probable que la disminución en los niveles de bases esfingoideas observada en las semillas germinadas en

presencia de FB1 10 μM se deba a la conversión de estas bases en sus derivados fosforilados y posteriormente, en hexadecanal y fosfotetanolamina (Pyne y Pyne, 2000)

La inhibición en el crecimiento de radículas y coleoptilos de las semillas germinadas en presencia de FB1 10 μM corresponde al tiempo de máxima acumulación de bases esfingoideas, por lo que es posible que esta acumulación sea la causa del efecto fitotóxico observado. Aunque esta dosis fue la más alta que se probó, todavía corresponde a niveles comparables con los de la incidencia natural de la toxina en maíz, pues sería equivalente a 7.21 ppm. En el estado de Sonora, se han encontrado semillas de maíz con FB1 en concentraciones desde 0.67 hasta 13.3 ppm (Cortez-Rocha *et al.*, 2003).

3. Efecto de la FB1 sobre los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz durante la germinación

Para los estudios de expresión del transcrito de HRGP utilizando FB1 se eligió la dosis de 10 μM , ya que fue la que produjo una mayor inhibición del crecimiento radicular y una mayor acumulación de bases esfingoideas. Esta dosis es cercana al valor de la constante de inhibición de la H^+ -ATPasa por la toxina en estudios *in vitro*, que es 17.5 μM . Asimismo, Wang y colaboradores (1991) encontraron que la IC_{50} para la inhibición de la esfinganina-*N*-aciltransferasa por FB1 es de 0.1 μM en preparaciones microsomales de rata.

San Juan Badillo (2000) demostró que la FB1 10 μM induce la transcripción de diversos genes de defensa. Uno de los genes que se expresa más abundantemente en presencia de la toxina es el de la HRGP, una proteína de reforzamiento de pared celular que se induce e insolubiliza en la pared celular durante el desarrollo normal de las plantas, así como por heridas y ataque de organismos patógenos (Cassab, 1998; Bucher *et al.*, 2002).

En este estudio no se pudo detectar al transcrito en los embriones, por lo que se continuó el análisis en ejes embrionarios de maíz germinados en medio MS suplementado con sacarosa, pues los niveles en este tejido son abundantes. En estudios previos se estableció que el mRNA de HRGP se acumula en tejidos jóvenes que contienen células en división activa, tales como el coleoptilo, el nodo, la plúmula y el ápice de la raíz. En contraste, en escutelo y en tejidos adultos, la acumulación de este transcrito es baja. El mRNA correspondiente a la HRGP de maíz se acumula transitoriamente en las células provasculares de las plántulas, hojas jóvenes y raíces. Asimismo se reporta que la transcripción de este gen se induce en respuesta

a daño mecánico, elicitores microbianos, ataque de patógenos y tratamiento con etileno (García-Muñiz *et al.*, 1998).

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado, ya que se observó la presencia del transcrito a partir de las 6 horas de germinación, tanto en los ejes control como en los ejes germinados en presencia de FB1 10 μM . A partir de las 12 horas de germinación ocurrió un incremento en los niveles de transcrito presente en los ejes embrionarios germinados en presencia de FB1 con respecto al control, que alcanza un máximo a las 24 horas, manteniéndose niveles elevados de transcrito por lo menos hasta las 72 horas de germinación. Rivas San Vicente (2001) demostró que en ejes embrionarios germinados en presencia de FB1 10 μM existe un máximo de acumulación de esfinganina a las 24 horas, pero desde las 12 horas detecta que hay tres veces más esfinganina que en el control. Estos datos sugieren que podría existir una correlación entre los niveles de esfingolípidos y la inducción de la transcripción del gen de la HRGP.

En la autorradiografía se observaron dos bandas que tienen un patrón de expresión similar. Se determinaron los tamaños de los dos transcritos utilizando marcadores para RNA encontrándose un transcrito de aproximadamente 1430 nucleótidos y otro de 1280 nucleótidos. Aun cuando en la literatura no se ha reportado la longitud del transcrito ni se ha mapeado el sitio de inicio de la transcripción, los tamaños estimados en este trabajo son consistentes con la secuencia del gen *ZmHRGP*, que es de aproximadamente de 1600 nucleótidos y contiene un intrón de 150 pb en la región 3'-UTR. La explicación a la causa de la aparición de las dos bandas se discutirá más adelante.

4. Efecto de los esfingolípidos en los niveles de transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz durante la germinación.

4.1 Efecto de la esfinganina y la ceramida

Para investigar si el incremento en el nivel de expresión de la HRGP causado por la FB1 se debe a la acumulación de las bases esfingoideas, se realizó un Northern Blot de ejes embrionarios germinados en presencia de esfinganina 10 μM . Las semillas germinadas en presencia de esta base esfingoidea tienen radículas y coleótilos más pequeños que las semillas control. Los resultados mostraron una inducción discreta de los niveles de transcrito durante las primeras 48 horas de germinación. El mRNA para la HRGP aumenta notoriamente

a las 72 horas de germinación, alcanzando un máximo de expresión comparable con el máximo nivel que induce la FB1 a las 24 horas. El retraso en la inducción de la expresión del gen se puede deber a varios factores: a) la dosis de esfinganina que penetra en los ejes embrionarios de maíz es diferente de la cantidad de esfinganina que se acumula en los ejes embrionarios por efecto de la fumonisina, por lo que no es suficiente para inducir la expresión del gen a tiempos similares a la FB1; b) la FB1 se puede unir directamente a blancos moleculares de la esfinganina y fitoesfingosina importantes para la transducción de señales, produciendo una respuesta más rápida. Este fenómeno se ha reportado en fibroblastos de ratón, en los que la FB1 activa rápidamente una cascada de señalización por MAPK previa a la acumulación de bases esfingoideas (Wattenberg *et al.*, 1996); c) los esfingolípidos añadidos al medio de germinación pueden degradarse. En el laboratorio se han hecho experimentos para probar la estabilidad de los esfingolípidos en el medio y se ha observado que el efecto inductor de la esfingainina sobre la acumulación del ácido salicílico se mantiene cuando se transfieren los embriones cada 24 horas con el compuesto (Rivas San Vicente, 2004); d) las bases esfingoideas no son responsables del incremento en los niveles de transcrito ocasionado por la FB1. En este caso es posible que la disminución en los niveles de esfingolípidos complejos puedan inducir la transcripción del gen. En experimentos similares en los que se analizó la inducción de la expresión del transcrito de la enzima fenil alanina amonio liasa (PAL) por la FB1, se encontró que las bases esfingoideas presentaron un efecto muy similar a la toxina. En estos experimentos se concluyó que las bases esfingoideas sí son responsables directas de la inducción del gen de la PAL (Rivas San Vicente, 2001). Por lo anterior existe una posibilidad importante de que las bases esfingoideas no sean las responsables del incremento en la expresión del gen de la HRGP por la FB1. Para comprobarlo se realizaron experimentos con inhibidores de la enzima serina palmitoiltransferasa, responsable de la síntesis de bases esfingoideas.

Debido a que los niveles relativos de las distintas pozas de esfingolípidos parecen ser un componente importante en su función como reguladores celulares, se probó el efecto de la ceramida C6 (10 μM) en la expresión de la HRGP. Recientemente se ha caracterizado una mutante de *Arabidopsis thaliana* (*acd5*), que muestra muerte celular acelerada constitutiva por acumulación de ceramida, ya que la mutación está en el gen de la ceramida cinasa, que reduce los niveles del esfingolípidos (Liang *et al.*, 2003). Se empleó C6 ceramida (10 μM) porque la cadena corta la hace más soluble y puede incorporarse al medio de germinación,

además es capaz de penetrar los tejidos. Los resultados muestran una discreta inducción del transcrito. Sin embargo, se observa consistentemente un barrido en las muestras tratadas con ceramida, que probablemente se debe a que se promueve un gran recambio de transcritos en presencia de este esfingolípido. Se sabe que la ceramida es capaz de inducir apoptosis en células animales (Lee *et al.*, 2000), por lo que también existe la posibilidad de que el incremento en los niveles de transcrito y el barrido observado se deba a muerte celular. Aunque no lo hemos demostrado experimentalmente en nuestro sistema, suponemos que el incremento en los niveles de bases esfingoideas va acompañado por una reducción en los niveles de ceramida y, posiblemente, de esfingolípidos complejos también.

4.2 Efecto de inhibidores de la síntesis de bases esfingoideas

La FB1 tiene dos efectos en los niveles de esfingolípidos: incrementa la concentración de bases esfingoideas y provoca una disminución en los niveles de esfingolípidos complejos que se ha demostrado en células animales (Merrill *et al.*, 2001). Para discernir si el incremento en la expresión de la HRGP ocasionada por la FB1 es debida al aumento en los niveles de bases esfingoideas o a la disminución de la cantidad de esfingolípidos complejos, se utilizaron dos inhibidores de la serina palmitoil transferasa, que cataliza la primera reacción de síntesis de esfingolípidos (Merrill *et al.*, 2001).

La β -cloroalanina es un inhibidor irreversible de enzimas que tienen piridoxalfosfato como cofactor, entre las que se encuentran las transaminasas de alanina y aspartato, por lo que no es específica de la SPT. Este inhibidor se une a la enzima, inactivándola de manera irreversible (Ikushiro *et al.*, 2004). En el experimento se probaron tres dosis de β -cloroalanina (0.5, 2 y 2.5 mM) a dos tiempos de germinación donde la inducción de la HRGP por fumonisina es elevada. Al utilizar este inhibidor se observó que existe una disminución en los niveles de transcrito a las 24 horas, pero un incremento a las 36 horas. A pesar de que existen reportes de que la β -cloroalanina no ocasiona perturbaciones significativas en otras funciones celulares (Hanada *et al.*, 2000), al ser un inhibidor no específico y al aplicarse en una dosis tan alta es posible que los efectos observados se deban a la inhibición de otras enzimas que contienen piridoxal fosfato.

Para reducir este problema de especificidad, se utilizó la miriocina, que es un inhibidor con una alta afinidad por la SPT. Con este inhibidor se obtuvo un incremento muy notable en

los niveles de transcrito con respecto al control a todas las dosis probadas. La concentración de miriocina necesaria para inducir un incremento en la transcripción del gen fue de 10 nM; una dosis tan pequeña indica que el inhibidor es altamente específico para la enzima y consistente con los datos de la literatura (Ikushiro *et al.*, 2004). Al actuar sobre los ejes embrionarios de maíz, la miriocina disminuye los niveles tanto de bases esfingoideas como de esfingolípidos complejos. Debido a que los efectos de la miriocina son comparables a los causados por la FB1 y no a los efectos observados con bases esfingoideas, se sugiere que el incremento en la transcripción del gen de la HRGP es independiente de éstas y se debe a la disminución de esfingolípidos complejos.

Este resultado contrasta con la expresión del gen de la PAL, otra enzima involucrada en mecanismos de defensa, pues la FB1 y la esfinganina inducen su transcripción, mientras que la miriocina no mostró ningún efecto (Rivas San Vicente, 2004). Estos resultados sugieren que tanto las bases esfingoideas como los esfingolípidos complejos podrían participar en la regulación de distintas vías de defensa y que la HRGP no participa en la vía dependiente de ácido salicílico, a pesar de que la FB1 causa un aumento en los niveles este compuesto producido aparentemente por el incremento en la concentración de bases esfingoideas (Rivas San Vicente, 2004). García Muñiz y colaboradores (1998) reportaron que el aumento en la expresión del gen de la HRGP no está regulado por el ácido salicílico

5. Determinación del origen de los transcritos de la HRGP.

El procesamiento alternativo del RNAm precursor es un mecanismo importante de regulación de la expresión genética en eucariontes superiores y una fuente de diversidad funcional pues a partir de un transcrito primario se pueden generar varias proteínas con estructura y función distinta (Simpson y Filipowicz, 1996). En animales este proceso está sujeto a regulación por el desarrollo o es específico de tejido y en algunos casos el mecanismo que controla estos eventos alternativos se ha caracterizado y se han definido los factores *cis* y *trans* que participan (Black, 2003). En contraste, en plantas se han descrito algunos ejemplos de procesamiento alternativo, pero en realidad hay poca información sobre el significado biológico funcional de los productos alternativos que se generan del transcrito primario. La situación más común en células vegetales es la acumulación del transcrito no procesado que en algunos casos constituye un 50% del total del ese RNAm particular. Este fenómeno refleja

probablemente una baja eficiencia de procesamiento más que una forma de regulación y contrasta con la situación de mamíferos en que no ocurre acumulación de RNAs sin procesar (Simpson y Filipowicz, 1996). Se ha propuesto que una función de la presencia de un intrón en una población de RNAm puede potencialmente regular los niveles de éstos ya que genera competencia por otros eventos de procesamiento de RNA, como es la poliadenilación. Esto es porque los sitios de poliadenilación presentes en un intrón pueden competir con el aparato de procesamiento, resultando en muchos transcritos que son poliadenilados prematuramente (Brown y Simpson, 1998). Se sabe que en *A. thaliana* alrededor del 2-3% de los genes retienen los intrones. De estos genes, una gran proporción contiene los intrones en las regiones UTR. Se ha demostrado que algunos tipos de estrés, tales como la exposición al frío, a metales pesados o en anaerobiosis, los patrones de procesamiento cambian en varias plantas. Existe un reporte de que el tratamiento de plántulas de maíz con cadmio ocasionó un incremento específico de 20 veces del transcrito de Bz2 y un incremento de 50 veces del transcrito sin procesar. Aún se desconocen los mecanismos a través de los cuales el estrés modifica el procesamiento en plantas. Es interesante que aproximadamente el 10% de los transcritos que retienen los intrones están relacionados con condiciones de estrés. Si un estímulo específico influencia la retención de los intrones, entonces es posible que la presencia o ausencia del intrón establezca o modifique la función biológica de los mensajeros (Ner-Gaon *et al.*, 2004).

Debido a la clara presencia de dos bandas en el Northern blot, cuya separación corresponde a la diferencia en tamaño del transcrito procesado y sin procesar, se exploró la posibilidad de que el transcrito de mayor tamaño correspondiera a un RNAm que hubiese retenido el intrón. Además, como ambos transcritos presentaron una abundancia similar en todas las muestras se consideró que se podría detectar por RT-PCR un cDNA que contuviese el intrón al utilizar un cebador (FwdInt1) diseñado con base en la secuencia del único intrón. Se pudo detectar el cDNA correspondiente al transcrito procesado pero no se obtuvo una amplificación clara y reproducible cuando se empleó el cebador FwdInt1, y tampoco se pudo amplificar esta secuencia a partir del DNA de un banco de cDNA de maíz por lo que no se sostiene la hipótesis de un procesamiento alternativo como fuente de dos transcritos. La señal de poliadenilación canónica de RNAm en plantas (AATAAA) (Joshi, 1987) se localiza en el exón 2 y aunque en el intrón hay secuencias ricas en AT, se tendría que probar su funcionalidad como señales de poliadenilación.

Asimismo, se realizaron continuamente búsquedas en la base de datos del genoma de maíz (www.maizegdb.org) que contiene mas de 50 secuencias EST reportadas con una alta similitud a la región codificante de la HRGP y solamente se identificó una secuencia (EST CF349276; GenBank: 33942676) que contenía el intrón en la región 3' UTR. Este cDNA proviene de una biblioteca hecha a partir de RNAm de saco embrionario de maíz, que representa una etapa temprana en el desarrollo de la semilla.

Tampoco se obtuvieron evidencias de la presencia de un segundo gen de la HRGP en la raza "Chalqueño" de maíz, pues la sonda específica de la región 3'UTR detectó, al igual que la sonda completa, a ambos transcritos en el Northern blot. No se pudo establecer por Southern blot el número posible de genes en esta raza de maíz, pero experimentos reportados por Stiefel *et al.* (1990) presentan evidencias de uno o dos genes en diferentes líneas y razas de maíz. Las evidencias experimentales indicadas arriba sugieren entonces que el transcrito de menor tamaño proviene de la degradación del transcrito mayor, probablemente como un primer paso en el rápido recambio que sufre el mRNA de este gen.

Una tercera posibilidad es que el transcrito tenga dos sitios distintos de inicio de la transcripción. Esto se ha documentado en transcritos de genes mitocondriales de maíz, pues en un blot de RNA se obtienen múltiples bandas al hibridar con la sonda correspondiente a ese transcrito. Por ejemplo, para el gen *atp9* mitocondrial de maíz se identificaron, por ensayos de extensión de primer, cinco transcritos de longitudes distintas que varían hasta en 200 pb y que se generan a partir de distintos sitios de inicio de la transcripción (Mulligan *et al.* 1988). En el gen *coxIII* mitocondrial de maíz se identificaron también dos sitios distintos de inicio de la transcripción separados por 39 pb. Esta diversidad en los sitios de inicio de transcripción es un indicio de la falta de una señal consenso en los genes mitocondriales de maíz pues la única característica particular de estas regiones es un alto contenido de A + T (Mulligan *et al.*, 1988). Esta particularidad de la amplia multiplicidad de tamaños de los transcritos no se comparte para los genes nucleares de maíz. En particular para el gen *ZmHRGP* se localiza una sola caja canónica TATA (TATATAA) en la posición -112 con respecto al codón de inicio (Raz *et al.*, 1992) y el análisis de la secuencia no hace evidente ninguna otra caja TATA o CAAT que pudiera funcionar como sitio de inicio de la transcripción. Sin embargo, se tendría que probar esta hipótesis mediante ensayos de extensión de primer pues el sitio de inicio de transcripción no se ha mapeado en este gen.

Otro evento que puede generar heterogeneidad de transcritos es el procesamiento de la región 3'-UTR previo a la poliadenilación. Aunque el gen *ZmHRP* contiene la secuencia canónica AAUAAA de poliadenilación, ésta no necesariamente es funcional y podría ser sustituida por otros motivos en la región 3'-UTR, como se ha demostrado para algunos genes de plantas que tienen múltiples sitios de procesamiento de poliadenilación (Rothnie, 1996). Por ejemplo en el transcrito del gen CPRBP30 de *Nicotiana plumbaginifolia* se identificaron 14 sitios de procesamiento en una secuencia de 95 nucleótidos de la región 3'-UTR (Klahre *et al.*, 1995). Es interesante notar que este gen, al igual que el gen *ZmHRP*, contiene un intrón en la región 3'-UTR y uno de los sitios de poliadenilación se encuentra dentro del intrón que no es procesado en una población de transcritos. Para investigar si este mecanismo opera en la generación de los dos transcritos observados podrían realizarse ensayos de amplificación de los extremos de cDNA (3' RACE).

IX. CONCLUSIONES

Las semillas no pierden viabilidad cuando germinan en presencia de fumonisina B1, sin embargo la toxina causa acumulación de bases esfingoideas e inhibe el crecimiento radicular y del coleoptilo en dosis de 10 μM , lo que sugiere el requerimiento de la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos en esta etapa del desarrollo.

La incubación de las semillas con FB1 (10 μM) incrementa de manera significativa la expresión del gen de la HRGP.

El gen de la HRGP se induce ligeramente en presencia de esfinganina (10 μM), sin embargo, el efecto observado es posterior que el causado por la FB1 (10 μM).

La ceramida C6 (10 μM) no tiene un efecto significativo en los niveles de expresión de la HRGP en semillas de maíz.

El tratamiento con miriocina causó una elevación en los niveles de transcrito similar al ocasionado por la FB1, lo que indica que la regulación transcripcional de este gen está mediada por los niveles de esfingolípidos complejos, que probablemente disminuyeron.

Los experimentos realizados para explicar la presencia de dos transcritos de la HRGP sugieren que el transcrito de menor tamaño proviene del transcrito de mayor tamaño probablemente como una primera etapa durante la degradación del transcrito que tiene un rápido recambio.

X. BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, H.K., TANAKA, T., DUKE, S.O., PORTER, J.K., WRAY, E.M., HODGES, L., SESSIONS, A.E., WANG, E., MERRIL, A.H., RILEY, R.T. (1994) Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.* **106**: 1085-1093.
- ABELSON J., SIMON, M., MERRIL, A.Jr. HANNUN, Y. (2000) Methods in Enzymology, Volume 311: Sphingolipid Metabolism and Cell Signaling, Part A. p.p. 361-371
- AHN, J.H., LEE, J.S. (2003) Sugar acts as a regulatory signal on the wound-inducible expression of *SbHRGP3::GUS* in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* **22**:286-293.
- ALESSENKO, A.V. (1997) Functions of sphingosine in cell proliferation and death. *Biochemistry-US.* **63**: 62-75
- ASAI, T., STONE, J.M., HEARD, J.E., KOVTUN, Y., YORGEY, P., SHEEN, J., AUSUBEL, F.M. (2000) Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell.* **12**:1811-1835.
- BEWLEY, J. y BLACK, M. Seeds Biology of Development and Germination. 2a edición. Plenum Press. EUA. 1994. pp 1-33, 99-111, 147-197.
- BILLE, J., WEISER, T., BENTRUP, F.W. (1992) The lysolipid sphingosine modulates pyrophosphatase activity in tonoplast vesicles and isolated vacuoles from a heterotrophic cell suspension culture of *Chenopodium rubrum*. *Physiol. Plantarum.* **84**:250-254.
- BIRCH, P.R.J., AVROVA, A.O., DUNCAN, J.M., LYON, G.D., TOTH, R.L. (1999) Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Microbe Int.* **12**: 356-361.
- BLACK, D.L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 291-336.
- BOVE, J., JULLIEN, M., GRAPPIN, P. (2001) Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol.* **3**: 1002.1-1002.5
- BOHN, M., HEINZ, E., LÜTHJE, S. (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Arch. Biochem Biophys.* **387**:35-40.

- BORNER, G., SHERRIER, D., WEIMAR, T., MICHAELSON, L., HAWKINS, N., MACASKILL, A., NAPIER, J., BEALE, M., LILLEY, K., DUPREE, P. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* **137**:104-116.
- BRODERSEN, P., PETERSEN, M., PIKE, H.M., OLSZAK, B., SKOV, S., ODUM, N., JORGENSEN, L.B., BROWN, R.E., MUNDY, J. (2002) Knockout of *Arabidopsis ACCELERATED-CELL-DEATH11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Gene Dev.* **16**:490-502.
- BROMLEY, P.E., LI, Y.O., MURPHY, S.M., SUMNER, C.M., LYNCH, D.V. (2003) Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **417**:219-226.
- BROWN, J.W.S., SIMPSON, C.G. (1998). Splice site selection in plant pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 77-95.
- BUCHER, M., BRUNNER, S., ZIMMERMANN, P., ZARDI, G.I., AMRHEIN, N., WILLMITZER, L., RIESMEIER, J.W. (2002) The expression of an extensin-like protein correlates with cellular tip growth in tomato. *Plant Physiol.* **128**:911-923.
- CASSAB, G.I. (1998) Plant Cell Wall Proteins. *Annu. Rev. Plant Phys.* **49**:281-309.
- CHALFANT, C.E., SZULC, Z., RODDY, P., BIELAWSKA, A., HANNUN, Y.A. (2004) The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases. *J. Lipid Res.* **45**: 496-506.
- CHENG, J., PARK, T., FISCHL, A., YE, X. (2001) Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **21**:6198-6209
- CIACCI-ZANELLA, J.R., MERRIL, A.H., WANG, E., JONES, C. (1998) Characterization of cell-cycle arrest by fumonisin B1 in CV-1 cells. *Food Chem. Toxicol.* **36**:791-804.
- CORBIN, D.R., SAUER, N., LAMB, C.J. (1987) Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Mol. Cell. Biol.* **7**:4337-4344.
- CORTEZ-ROCHA, M., RAMÍREZ-ASTUDILLO, W., SÁNCHEZ-MARIÑEZ, R., ROSAS-BURGOS, E., WONG-CORRAL, F., BORBOA-FLORES, J., CASTILLÓN-CAMPAÑA, L., TEQUIDA-MENESES, M. (2003) Fumonisin and fungal species in corn from Sonora, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **70**: 668-673.

- COURSOL, S., FAN, L.M., LE STUNFF, H., SPIEGEL, S., GILROY, S., ASSMAN, S.M. (2003) Sphingolipid signaling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* **423**:651-654.
- CRUZ-GARCÍA, F., GÓMEZ, A., ZUÑIGA, J.J., PLASENCIA, J., VÁZQUEZ-RAMOS, J.M. (2003) Cloning and characterization of a COBRA-like gene expressed *de novo* during maize germination. *Seed Sci. Res.* **13**: 209-217.
- DA SILVA, A.F., RODRIGUES, M.L., FARIAS,S.E., ALMEIDA,I.C., PINTO, M.R., BARRETO-BERGTER, E. (2004) Glucosylceramides in *Colletotrichum gloeosporioides* are involved in differentiation of conidia into mycelial cells. *FEBS Lett.* **561**:137-143.
- DESAI, K., SULLARDS, C., ALLEGOOD, J., WANG, E. SCHMELZ, E.M. HARTL, M., HUMPF, H.U., LIOTTA, D.C., PENG, Q., MERRIL, A.H. (2002) Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *B B Acta.* **1585**:188-192
- DICKSON, R.C. (1998) Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison to mammals. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:27-48
- DING, L., ZHU, J.-K. (1997) A role of arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. *Planta.* **203**: 289-294.
- DOEHLERT, D.C., KNUTSON, C.A., VESONDER, R.F. (1994) Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia.* **127**:117-121
- DOW, J.M., DAVIES, H.A., DANIELS, M.J. (1998) A metalloprotease from *Xanthomonas campestris* that specifically degrades proline/hydroxyproline-rich glycoproteins of the plant extracellular matrix. *Mol. Plant Microbe In.* **11**: 1085-1093.
- DUNN, T.M., LYNCH, D., MICHAELSON, L.V., NAPIER, J.A. (2004) A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in Arabidopsis thaliana. *Ann. Bot.-London* **93**:483-497.
- DYATLOVITSKAYA, E.V. (1998) Correlation between bioeffector characteristics of sphingolipids and the structure of their hydrophobic fragment. *Biochemistry (Moscow)* **63**: 55-61
- EL-GENDY, W., BROWNLEADER, M.D., ISMAIL, H., CLARKE, P.J., GILBERT, J., EL-BORDINY, F., TREVAN, M., HOPKINS, J., NALDRETT, M., JACKSON, P. (2001) Rapid deposition of wheat cell wall structural proteins in response to *Fusarium*-derived elicitors. *J. Exp. Bot.* **54**:85-90.

- ELLIOTT, K.A., SHIRSAT, A.H. (1998) Promoter regions of the *extA* extensin gene from *Brassica napus* control activation in response to wounding and tensile stress. *Plant Mol. Biol.* **37**:675-687.
- ENDER F., HALLMANN, A., AMON, P., SUMPER, M. (1999) Response to the sexual pheromone and wounding in the green alga *Volvox*: induction of an extracellular glycoprotein consisting almost exclusively of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.* **274**:35023-35028.
- FERKET, K.A., LEVERY, S.B., PARK, C., CAMMUE, B.P., THEVISSSEN, K. (2003) Isolation and characterization of *Neurospora crassa* mutants resistant to antifungal plant defensins. *Fungal Genet. Biol.* **40**:176-185.
- FERRIS, P.J., WOESSNER, J.P., WAFFENSCHMIDT, S., KILZ, S., DREES, J., GOODENOUGH, U. (2001) Glycosylated polyproline II rods with kinks as a structural motif in plant hydroxyproline-rich glycoproteins. *Biochemistry-US.* **40**:2978-2987.
- FLORES, E. *La planta, estructura y función*. Ed. El Libro Universitario. Costa Rica. 1999 pp. 773-803.
- FOSTER, A.S., GIFFORD, E.M. *Comparative morphology of vascular plants*. W.H. Freeman and Company. USA. 1959. pp. 536.
- GALLARDO, K., JOB, C., GROOT, S., PUYPE, M., DEMOL, H., VANDERKERCKHOVE, J., JOB, D. (2001) Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol.* **126**: 835-848.
- GAMANYA R., SIBANDA, L. (2001) Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B₁ in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. *Int. J. Food Microbiol.* **71**:145-149.
- GARCÍA-MUNIZ, N., MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J.A., PUIGDOMÉNECH, P. (1998) Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein by fungal elicitors. *Plant Mol. Biol.* **38**:623-632.
- GILLMOR, C.S., LUKOWITZ, W., BRININSTOOL, G., SEDBROOK, J.C., HAMANN, T., POINTDEXTER, P., SOMERVILLE, C. (2005) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are required for cell wall synthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **17**: 1128-1140.
- GOETZL, E., AN, S. (1998) Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *FASEB J.* **12**:1589-1598.

- GOPEE, N., SHARMA, R.P. (2003) Sphingoid bases and their phosphates: transient activation and delayed repression of protein kinase C isoforms and their possible involvement in fumonisin B1 cytotoxicity. *Toxicology*. **187**:239-250.
- GOZZO, F. (2003) Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *J. Agr. Food Chem.* **51**:4487-4503.
- GUTIÉRREZ-NÁJERA, N., MUÑOZ-CLARES, R., PALACIOS BAHENA, S., RAMÍREZ, J., SÁNCHEZ-NIETO, S., PLASENCIA, J., GAVILANES-RUIZ, M. (2005) Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta*. (En prensa).
- HAMAGUCHI, A., SUZUKI, E., MURAYAMA, K., FUJIMURA, T., HIKITA, T., KAZUHISA, I., HANDA, K., WITHERS, D.A., MASTERS, S.C., FU, H., HAKOMORI, S. (2003) A sphingosine-dependent protein kinase that specifically phosphorylates 14-3-3 (SDK1) is identified as the kinase domain of PKCδ: a preliminary note. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**:589-594.
- HAMMOND-KOSSACK, K., JONES, J.D.G. Response to Plant Pathogens. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. EUA. 2000. pp. 1102-1156; 52-108.
- HANADA, K., HARA, T., NISHIJIMA, M., KUGE, O., DICKSON, R., NAGIEC, M.M. (1997) A mammalian homolog of the yeast *LCB1* encodes a component of serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the first step in sphingolipid synthesis. *J. Biol. Chem.* **272**: 32108-32114.
- HANADA, K., NISHIJIMA, M., FUJITA, T., KOBAYASHI, S. (2000) Specificity of inhibitors of serine palmitoyltransferase (SPT), a key enzyme in sphingolipid biosynthesis, in intact cells. *Biochem. Pharmacol.* **59**:1211-1216.
- HANNUN, Y.A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*. **274**: 1855-1859.
- HE, Q., RILEY, R.T. SHARMA, R.P. (2001) Fumonisin-induced tumor necrosis factor- α expression in a porcine kidney cell line is independent of sphingoid base accumulation induced by ceramide synthase inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **174**:69-77.
- HETHERINGTON, A.M. (2001) Guard cell signaling. *Cell*. **107**: 711-714.
- HLA, T. (2003) Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol. Res.* **47**:401-407.

- HORVATH, A., SUETTERLIN, C., MANNING-KRIEG, U., MOVVA, N.R., RIEZMAN, H. (1994) Ceramide synthesis enhances transport of GPI-anchored proteins to the Golgi apparatus in yeast. *EMBO J.* **13**: 3687-3695.
- HUWILER, A., KOLTER, T., PFEILSCHIFTER, J., SANDHOFF, K. (2000) Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *B B Acta.* **1485**: 63-99.
- IKUSHIRO, H., HAYASHI, H., KAGAMIYAMA, H. (2004) Reactions of serine palmitoyltransferase with serine and molecular mechanisms of the actions of serine derivatives as inhibitors. *Biochemistry-US.* **43**:1082-1092.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990) High efficiency transformants of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96**: 23-28.
- JARVIS, W.D., FORNARI, F.A., TRAYLOR, R.S., MARTÍN, H.A., KRAMER, L.D. ERUKULLA, R.K., BITTMAN, R., GRANT, S. (1996) Induction of apoptosis and potentiation of ceramide-mediated cytotoxicity of sphingoid bases in human myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **27**: 8275-8284.
- JENKINS, G.M., RICHARDS, A., WAHL, T., MAO, C., OBEID, C., HANNUN, Y. (1997) Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**: 32566-32572.
- JOSÉ-ESTANYOL, M., PUIGDOMENECH, P. (1998) Developmental and hormonal regulation of genes coding for proline-rich proteins in female inflorescences and kernels of maize. *Plant Physiol.* **116**:485-494.
- JÓSHI, CP. (1987). Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucleic Acid Res.* **15**: 9627-40
- KLAHRE, U., HEMMINGS-MIESZCZAK, M., FILIPOWITZ, W. (1995) Extreme heterogeneity of polyadenylation sites in mRNAs encoding chloroplast RNA-binding proteins in *Nicotiana glumbaginifolia*. *Plant Mol. Biol.* **28**: 569-574.
- KOGA, J., YAMAUCHI, T., SHIMURA, M., OGAWA, N., OSHIMA, K., UMEMURA, K., KIKUCHI, M., OGASAWARA, N. (1998) Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J. Biol. Chem.* **273**: 31985-31991.
- LALANE, E., HONY, D., JOHNSON, A., BORNER, G.H.H., LILLEY, K.S., DUPREE, P., GROSSNIKLAUS, U., TWELL, D. (2004) SETH1 and SETH2, two components of the

- glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **16**: 229-240.
- LE STUNFF, H., GALVE-ROPERH, I., PETERSON, C., MILSTIEN, S., SPIEGEL, S. (2002) Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J. Cell Biol.* **158**: 1039-1049.
- LIANG, H., YAO, N., SONG, J.T., LUO, S., LU, H., GREENBERG, J.T. (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.* **17**:2636-2641.
- LINK, V., HOFMANN, M.G., SINHA, A.K., EHNESS, R., STRNAD, M., ROITSCH T. (2002) Biochemical evidence for the activation of distinct subsets of mitogen-activated protein kinases by voltage and defense-related stimuli. *Plant Physiol.* **128**:271-281.
- LYNCH, D.V. (1993) Sphingolipids, In *Lipid Metabolism in Plants* (T.S. Moore, Jr., ed). CRC Press, Boca Raton, FL. 285-308.
- LYNCH, D.V., SPENCE, R., THEILING, K., THOMAS, K., LEE, M. Enzymatic reactions involved in ceramide metabolism. Biochemistry and molecular biology of membrane and storage lipids of plants. Murata, N., Somerville, C.R.(eds.) (1993) The American Society of Plant Physiologists.
- MAO C, XU R, SZULC ZM, BIELAWSKA A, GALADARI SH, OBEID LM. (2000) Cloning of an alkaline ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**:6876-6884.
- MEDLOCK, K.A., MERRILL, A.H. (1988) Inhibition of serine palmitoyltransferase *in vitro* and long-chain base biosynthesis in intact Chinese hamster ovary cells by β -chloroalanine. *Biochemistry-US.* **27**:7079-7084.
- MEGIDISH, T., TAKIO, K., TITANI, K., IWABUCHI, K., HAMAGUCHI, A., IGARASHI, A., HAKOMORI, S. (1999) Endogenous substrates of sphingosine-dependent kinases (SDKs) are chaperone proteins: heat shock proteins, glucose-regulated proteins, protein disulfide isomerase, and calreticulin. *Biochemistry-US.* **38**: 3369-3378.
- MENOSSI, M., MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J.A., PUIGDOMÉNECH, P. (1997). Promoter tissue specific activity and ethylene control of the gene coding for the maize hydroxyproline-rich glycoprotein in maize cells transformed by particle bombardment. *Plant Sci.* **125**:189-200.
- MENOSSI, M., RABANEDA, F., PUIGDOMÉNECH, P., MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J.A. (2003) Análisis of regulatory elements of the promoter and the 3' untranslated region of the maize *Hrgp* gene coding for a cell wall protein. *Plant Cell Rep.* **21**:916-923.

- MERRILL, A.H., HANNUN, Y.A., BELL, R.M. (1993) Introduction: sphingolipids and their metabolites in cell regulation. *Adv. Lipid Res.* 25: 1-24
- MERRILL, A.H., SCHMELZ, E.M., DILLEHAY, D.L., SPIEGEL, S., SHAYMAN, J.A., SCHROEDER, J.J., RILEY, R.T., VOSS, K.A., WANG, E. (1997) Sphingolipids –The enigmatic lipid class: Biochemistry, Physiology, and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharm.* **142**:208-225.
- MERRILL, A.H., SULLARDS, M.C., WANG, E., VOSS, K.A., RILEY, R.T. (2001) Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Persp.* **109**(Suplement 2):283-289.
- MEYER, B.S. Introduction to Plant Physiology. 2a edición. Ed. D. Van Nostrand Company. EUA. 1973. pp. 530-547.
- MILTHORPE, F.L. y MOORBY, J. An Introduction to Crop Physiology. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 1974. pp 111-123.
- MIN, J.K., YOO, H.S., LEE, E.Y., LEE, W.J., LEE, Y.M. (2002) Simultaneous quantitative analysis of sphingoid base 1-phosphates in biological samples by *o*-phthalaldehyde precolumn derivatization after dephosphorylation with alkaline phosphatase. *Anal. Biochem.* **303**: 167-175.
- MIYAKE, Y., KOZUTSUMI, Y., NAKAMURA, S., FUJITA, T., KAWASAKI, T. (1995) Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**: 396-403.
- MUTHUKRISHNAN, S., LIANG, GH., TRICK, HN., GILL, BS. (2001) Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell Tiss. Org.* **64**:93-114
- NELSON, P.E. (1993) Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**:233-252
- NER-GAON, H., HALACHMI, R., SAVALDI-GOLDSTAIN, S., RUBIN, E., OPHIR, R., FLUHR, R. (2004) Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in *Arabidopsis*. *Plant J.* **39**: 877-885.
- NEUFFER, G.M., COE, E.H., WESSLER, S.R. Mutants of Maize. Cold Spring Harbor Lab. Press. EUA. 1997. pp 17.
- NG, C., CARR, K., McAINSH, M.R., POWELL, B., HETHERINGTON, A.M. (2002) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-phosphate. *Nature.* **410**:516-519

- NIMCHUK, Z., EUGLEM, T., HOLT B.F., DANGL, J.L. (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* **37**: 579-609.
- OLSSON, P.A., KJELLBOM, P., ROSENDAHL, L. (2002) *Rhizobium* colonization induced changes in membrane-bound and soluble hydroxyproline-rich glycoprotein composition in pea. *Physiol. Plantarum.* **114**: 652-660.
- OSUCHOWSKI, M.F., JOHNSON, V.J., HE, Q., SHARMA, R.P. (2004) Myriocin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, alters regional brain neurotransmitter levels without concurrent inhibition of the brain sphingolipid biosynthesis in mice. *Toxicol. Lett.* **147**: 87-94.
- OTTE, O., BARZ, W. (2000) Characterization and oxidative *in vitro* cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls. *Phytochemistry.* **53**: 1-5.
- PAYNE, S.G., MILSTIEN, S., SPIEGEL, S. (2002) Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett.* **531**: 54-57
- PERRY, D.K. (2002) Serine palmitoyltransferase: role in apoptotic de novo ceramide synthesis and other stress responses. *B B Acta.* **1585**: 146-152
- PINELLI, E., POUX, N., GARREN, L., PIPY, B., CASTEGNARO, M., MILLER, D.J. PFOHL-LESZKOWICZ A. (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase by fumonisin B1 stimulates cPLA₂ phosphorylation, the arachidonic acid cascade and camp production. *Carcinogenesis.* **20**: 1683-1688.
- PYNE, S., PYNE, N.J. (2000) Sphingosine-1-phosphate signaling in mammalian cells. *Biochem. J.* **349**: 385-402.
- RAJJOU, L., GALLARDO, K., DEBEAUJON, I., VANDEKERCKHOVE, J., JOB, C., JOB, D. (2004) The effect of α -amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol.* **134**:1598-1613.
- RAVEN, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. *Biology of Plants*. 5a edición. Worth Publishers. EUA. 1992. pp 66-68, 441-452, 575-572.
- RAZ R, JOSE M, MOYA A, MARTINEZ-IZQUIERDO JA, PUIGDOMENECH P. (1992) Different mechanisms generating sequence variability are revealed in distinct regions of the hydroxyproline-rich glycoprotein gene from maize and related species. *Mol Gen Genet.* **233**: 252-9.

- RIVAS SAN VICENTE, M. (2001) Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de los niveles de bases esfingoideas en ejes embrionarios de maíz expuestos a la fumonisina B1. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- RIVAS SAN VICENTE, M. (2004) Asociación del metabolismo de esfingolípidos con la acumulación de ácido salicílico en tejidos vegetales. Tesis de Maestría. Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM. 99 p.
- RIBONI, L., BASSI, R., ANELLI, V., VIANI, P. (2002) Metabolic formation of ceramide-1-phosphate in cerebellar granule cells: evidence for the phosphorylation of ceramide by different metabolic pathways. *Neurochem. Res.* **27**: 771-716.
- RUÍZ-ÁVILA, L., BURGESS, S.R., STIEFEL, V., LUDEVID, M.D., PUIGDOMÉNECH, P. (1992) Accumulation of cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein mRNA is an early event in maize embryo cell differentiation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **89**: 2414-2418.
- RUSHTON, P.J., SOMSSICH, I.E. (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 311-315.
- RUVOLO, P.P. (2003) Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacological Research.* **47**: 383-392
- SAN JUAN BADILLO, 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. Facultad de Química, UNAM.
- SCHINDELMAN, G., MORIKAMI, A., JUNG, J., BASKIN, T.I., CARPITA, N., DERBYSHIRE, P., MCCANN, M.C., BENFEY, P.N. (2001) COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **15**: 1115-1127.
- SCHULTZ, C., GILSON, P., OXLEY, D., YOUL, J., BACIC, A. (1998) GPI-anchors on arabinogalctan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends Plant Sci.* **3**: 426-431.
- SHARMA, N., HE, Q., SHARMA, R. (2004) Sphingosine kinase activity confers resistance to apoptosis by fumonisin B(1) in human embryonic kidney (HEK-296) cells. *Chem. Biol. Interact.* **151**: 33-42
- SHIER, W.T. (1992) Sphingosine analogs: an emerging new class of toxins that includes the fumonisins. *J. Toxicol.* **11**: 241-257

- SHOWALTER, A.M. (2001) Introduction: plant cell wall proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 1361-1362.
- SIMPSON, GG, FILIPOWICZ, W. (1996). Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organization of the spliceosomal machinery. *Plant Molecular Biology.* **32**: 1-41.
- SKRZYPEK, M., LESTER, R.L., DICKSON, R.C. (1997) Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**: 1513-1520.
- SOUTER, M., PULLEN, M., TOPPING, J., ZHANG, X., LINDSEY, K. (2004) Rescue of defective auxin-mediated gene expression and root meristem function by inhibition of ethylene signaling in sterol biosynthesis mutants of *Arabidopsis*. *Planta.* **219**: 773-783.
- SPEHLING, P., HEINZ, E. (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *B B Acta.* **1632**: 1-15
- SPIEGEL, S., MILSTIEN, S. (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Mol. Cell Biol.* **4**: 397-407
- STIEFEL, V., RUÍZ-ÁVILA L., RAZ, R., VALLÉS, M.P., GÓMEZ, J., PAGÉS, M., MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J.A., LUDEVID, M.D., LANGDALE, J.A., NELSON, T., PUIGDOMÉNECH, P. (1990) Expression of a maize cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in early leaf and root vascular differentiation. *Plant Cell.* **2**: 785-793.
- STONE, J.M., HEARD, J.E., ASAI, T., AUSUBEL, F.M. (2000) Stimulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell.* **12**:1811-1822.
- STREET, H.E. y ÖPIK, H. The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development. 3a edición. Ed. Edward Arnold. Gran Bretaña. 1986. pp 5-25.
- SUGIURA, M., KONO, K., LIU, H., SHIMIZUGAWA, T., MINEKURA, H., SPIEGEL, S., KOHAMA, T. (2002) Ceramide kinase, a novel lipid kinase. *J. Biol. Chem.* **277**: 23294-23300
- SUHARSONO, U., FUJISAWA, Y., KAWASAKI, T., IWASAKI, Y., SATOH, H., SHIMAMOTO, K. (2002) The heterotrimeric G protein α subunit acts upstream of the small GTPase RAC in disease resistance of rice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **99**: 13307-13312.
- TAMURA, K., NISHIURA, H., MORI, J., IMAI, H. (2000). Cloning and characterization of a cDNA encoding serine palmitoyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Society Transactions.* **28**: 745-747.

- THOMAS, T.L. (1993) Gene expresión during plant embryogenesis and germination: an overview. *Plant Cell*. **5**: 1401-1410.
- THOMMA, B.P., PENNINGCKX, A., BROEKAERT, W.F., CAMMUE, B.P. (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* **13**: 63-68.
- TOYODA K., COLLINS, N.C., TAKAHASHI, A., SHIRASU, K. (2002) Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens. *Transgenic Res.* **11**: 567-582.
- UMEMURA, K., OGAWA, N., YAMAUCHI, T., IWATA, M., SHIMURA, M., KOGA, J. (2000) Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiol.* **41**: 676-683.
- VAN LOON, L.C. (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**: 753-765
- VAN LOON, L.C., VAN STRIEN, E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant P.* **55**: 85-97
- VERONESE, P., RUIZ, M.T., COCA, M.A., HERNÁNDEZ-LÓPEZ, A., LEE, H., IBEAS, J.I., DAMSZ, B., PARDO, J.M., HASEGAWA, R., BRESSAN, R.A., NARASIMHAN, M.L. (2003) In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiol.* **131**:1580-1590.
- VESPER, H., SCHMELZ, E.M., NIKOLOVA-HARAHASHIAN, M.N., DILLEHAY, D.L., LYNCH, D.V., MERRILL, A.H. (1999) Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 1239-1250.
- WALSH, C.T. (1984) Suicide substrates, mechanism-based enzyme inactivators: recent developments. *Annu. Rev. Biochem.* **53**: 493-535.
- WANG, W., NORRED, W.P., BACON, C.W., RILEY, R.T., MERRILL, A.H. (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J. Biol. Chem.* **266**(22): 14486-14490.
- WARNECKE, D., HEINZ, E. (2003) Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell Mol. Life Sci.* **60**: 919-941.
- WATANABE, R., FUNATO, K., VENKATARAMAN, K., FUTERMAN, A.H., RIEZMAN, H. (2002) Sphingolipids are required for the stable membrane association of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in yeast. *J. Biol. Chem.* **277**: 49538-49544.

- WATTENBERG, E.V., BADRIA, F.A., SHIER, W.T. (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by the carcinogenic mycotoxin fumonisin B1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**: 622-627.
- WISPRIYONO, B., SCHMELZ, E.M., PELAYO, H., HANADA, K., SEPAROVIC, D. (2002) A role for *de novo* sphingolipids in apoptosis of photosensitized cells. *Exp. Cell Res.* **279**: 153-165.
- WORRAL, D., NG, C.K., HETHERINGTON A.M. (2003) Sphingolipids, new players in plant signaling. *Trends Plant Sci.* **8**: 317-320.
- XU, X., BITTMAN, R., DUPORTAIL, G., HEISSLER, D., VILCHEZE, C., LONDON, E. (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). *J. Biol. Chem.* **276**: 33540-33546.
- YOSHIBA, Y., AOKI, C., IUCHI, S., NANJO, T., SEKI, M., SEKIGUCHI, F., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI, K. (2001) Characterization of four extensin genes in *Arabidopsis thaliana* by differential gene expression under stress and non-stress conditions. *DNA Res.* **8**: 115-122.

XI. APÉNDICE A

Preparación de reactivos

✓ **Solución de hipoclorito de sodio al 10%**

Cloralex	100 mL
Agua cbp.	1 L

✓ **Solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio (K₂HPO₃) 50 mM, pH 7**

K ₂ HPO ₃	1.742 g
Ajustar pH a 7	
Agua cbp.	200 mL

✓ **Solución de cloruro de potasio (KCl) 0.8%**

KCl	1.6 g
Agua cbp.	200 mL

✓ **Solución de hidróxido de potasio (KOH) 1 M**

KOH	11.22 g
Agua cbp.	200 mL

✓ **Solución de *o*-ftaldialdehido (OPA)**

OPA	2.5 mg
Etanol	50 µL
β-mercaptoetanol	3 µL
Sol. Boratos 3% cbp.	2.5 mL

✓ **Solución amortiguadora de boratos al 3%, pH 10.5**

Ácido bórico	3 g
Ajustar el pH a 10.5	
Agua cbp.	100 mL

✓ **Solución amortiguadora de fosfatos 5mM, pH 7**

K ₂ HPO ₃	0.1742 g
Ajustar pH a 7	
Agua cbp.	200 mL

✓ **Agua con DEPC**

DEPC	2 mL
Agua cbp.	1 L

Dejar en agitación toda la noche y esterilizar durante 1 hora.

✓ **GTE**

Tris 0.5 M	50 µL
EDTA 0.5 M	20 µL
Glucosa 0.1 M	500 µL
Agua	430 µL

✓ **Solución NaOH 0.2N/SDS 1%**

NaOH 1 N	200 µL
SDS 20%	50 µL
Agua	750 µL

✓ **Solución de acetato de potasio 3 M
pH 4.8**

Acetato de potasio	29.5 g
Ajustar el pH a 4.8	
Agua cbp.	100 mL

✓ **Solución de cloruro de sodio (NaCl)
4 M**

NaCl	11.7 g
Agua cbp.	50 mL

✓ **Solución TE**

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

✓ **Gel de agarosa al 1.2%**

Agarosa	1.82 g
MOPS 10X	15 mL
Agua cbp.	150 mL

✓ **Amortiguador MOPS 10X**

EDTA	10 mM
MOPS	0.2 M
Acetato de sodio (pH 7)	50 mM
Utilizar agua tratada con DEPC	

✓ **Solución SSC 20X**

NaCl	87.65 g
Citrato de sodio	44.1 g
Agua con DEPC cbp.	500 mL

✓ **Solución de hibridación**

Fosfato dibásico de sodio	0.5 M
Fosfato monobásico de sodio	0.5 M
SDS	7%
EDTA	10 mM
BSA	1%

✓ **Medio Luria**

NaCl	10 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaOH 2.5 N	1 mL
Agar	15 g
Agua cbp.	1 L

✓ **Medio SOC**

Peptona de caseína	2 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl 1M	1 mL
KCl 1M	0.25 mL
Mg ²⁺ 2M	1 mL
Glucosa 2M	1 mL
Agua cbp.	100 mL

✓ **Medio LB/ampicilina/IPTG/x-GAL**

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Ajustar el pH a 7	
Agua cbp.	1 L
Esterilizar durante 20 min. y dejar enfriar a 50° C.	
Ampicilina	100 µg/mL
IPTG	5 mM
X-Gal	80 mg/µL

✓ **Medio MS**

Sales MS	1.29 g
Agar	3 g
Sacarosa	6 g
Agua cbp.	300 mL

XII. APÉNDICE B

Datos obtenidos de la cuantificación de bases esfingoides.

Tabla 5. Niveles de fitoesfingosina en embriones de semillas de maíz germinados en presencia de distintas concentraciones de FB1

Tiempo Dosis	6 horas (pmoles/mg _{tej.})	12 horas (pmoles/mg _{tej.})	24 horas (pmoles/mg _{tej.})	36 horas (pmoles/mg _{tej.})	48 horas (pmoles/mg _{tej.})	72 horas (pmoles/mg _{tej.})
0.0 μM	0.31 ± 0.04	0.39 ± 0.09	0.96 ± 0.42	N.D	0.33 ± 0.05	0.51 ± 0.20
0.1 μM	0.40 ± 0.0	0.37 ± 0.02	0.25 ± 0.10	0.13 ± 0.0	0.24 ± 0.0	0.43 ± 0.05
1.0 μM	0.67 ± 0.29	0.44 ± 0.04	0.45 ± 0.0	0.33 ± 0.05	0.18 ± 0.0	0.65 ± 0.06
10 μM	0.46 ± 0.19	0.39 ± 0.18	0.45 ± 0.0	0.70 ± 0.26	2.35 ± 0.0	0.81 ± 0.0

Tabla 6. Niveles de esfinganina en embriones de semillas de maíz germinados en presencia de distintas concentraciones de FB1.

Tiempo Dosis	6 horas (pmoles/mg _{tej.})	12 horas (pmoles/mg _{tej.})	24 horas (pmoles/mg _{tej.})	36 horas (pmoles/mg _{tej.})	48 horas (pmoles/mg _{tej.})	72 horas (pmoles/mg _{tej.})
0.0 μM	N.D.	0.20 ± 0.0	0.31 ± 0.05	0.24 ± 0.06	0.27 ± 0.00	0.86 ± 0.09
0.1 μM	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.0	0.25 ± 0.08	0.12 ± 0.02	0.34 ± 0.08	0.67 ± 0.00
1.0 μM	0.01 ± 0.0	0.18 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.27 ± 0.08	1.67 ± 0.17
10 μM	0.16 ± 0.02	0.32 ± 0.08	0.50 ± 0.15	0.27 ± 0.03	1.53 ± 0.46	1.22 ± 0.27

Todos los datos se muestran con su error estándar.