



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE LA FITOTOXINA FUMONISINA B1 EN LA ACTIVIDAD DE LA 1,3-β-D GLUCAN SINTETASA DE EMBRIONES DE MAIZ

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

FRANCISCO JAVIER GARIBAY

100000



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Angelina Quintero Ruíz
Vocal: Prof. Adriana Camacho Villanueva
Secretario: Dra. Marina Gavilanes Ruíz
1er. Suplente: Prof. Rebeca E. Franco y Bourland
2o. Suplente: Prof. María de Lourdes Mayet Cruz

Sitio donde se desarrolló el tema:

Lab. 101. Departamento de Bioquímica

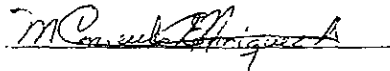
División de estudios de Posgrado. Facultad de Química. UNAM

Asesor del tema:



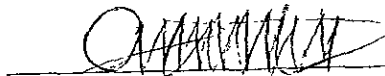
Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Supervisor técnico:



QFB. Consuelo Enríquez Arredondo

Sustentante:



Francisco Javier Garibay

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección de la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, y bajo la supervisión técnica de la QFB. Consuelo Enríquez Arredondo.

El trabajo de esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de DGAPA PAPIII, (UNAM) IN 204097 y de CONACYT-25131 B.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, por el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo y sobre todo por su gran calidad humana y experiencia profesional, nunca olvidare su empeño desinteresado para llegar a buen fin con este proyecto.

GRACIAS POR TODO DRA. MARINA.

A la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo por su apoyo técnico, moral y su profesionalismo para llevar a buen termino este trabajo, siempre te recordaré
Chelo

Al Dr. Javier Plasencia de la Parra y a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por su valiosa ayuda y por permitirme aprender un poco de su actividad profesional.

Al jurado revisor por las observaciones hechas a este trabajo

A mi esposa Aurora, por todo el apoyo brindado desde el inicio de mi carrera hasta la culminación de esta.

A mis nenas Diana, Karen y Tania

A mis hermanos Miguel, José Luis y Rubén.

A mi suegra Margarita Orozco Jiménez

A todos... GRACIAS.

ABREVIATURAS

Brij-58	Poliétilen-20-cetil éter.
BSA	Albúmina de suero bovino.
DTT	Ditioeritol.
EC	Catálogo enzimático.
FBI	Fumonisina B1.
FM	Fracción microsomal.
GS I	Glucan Sintetasa (I).
GS II	Glucan Sintetasa (II).
MP	Membrana plasmática.
ppm	Partes por millón.
r.p.m	revoluciones por minuto
UDPG	Uridín difosfo glucosa.
UV	Ultravioleta.
VMP	Vesículas de membrana plasmática.

INDICE

INTRODUCCION	1
1. Hongos patógenos de granos.	2
2. Micotoxinas.	4
3. Fumonisina B1.	8
4. Membrana plasmática.	12
5. Papel de la membrana plasmática en la interacción con patógenos.	14
6. Deposición de callosa.	18
7. 1,3- β -D-glucan sintetasa.	20
ANTECEDENTES INMEDIATOS.	24
HIPOTESIS	25
OBJETIVOS GENERALES.	25
OBJETIVOS PARTICULARES.	25
MATERIALES Y METODOS.	26
1 Material biológico.	26
2. Imbibición de embriones.	27
3. Extracción de la fracción microsomal.	27
4. Obtención de una preparación enriquecida en membranas plasmáticas.	28
5. Determinación de la actividad de la 1,3- β -glucan sintetasa.	28
6. Determinación de proteína.	30
7. Pruebas estadísticas.	30

RESULTADOS.	31
1. Aislamiento de vesículas de la fracción microsomal y de la membrana plasmática y rendimiento.	31
2. Optimización de las condiciones de medición de la actividad de la 1,3- β -glucan sintetasa.	32
3. Efecto <i>in vitro</i> de la FB1 sobre la actividad de la GS II.	40
4. Efecto <i>in vivo</i> de la FB1 sobre la actividad de la GS II.	42
DISCUSION.	44
CONCLUSIONES	49
APENDICE	51
BIBLIOGRAFIA.	53

INTRODUCCION

Los hongos son organismos eucarióticos y heterotróficos. Un gran número de especies de hongos ha adquirido la capacidad de desarrollar parte de su ciclo de vida en plantas, a menudo causando enfermedad en el hospedero. La invasión de plantas por hongos ha repercutido en el desarrollo de la civilización, ya que la historia de la raza humana ha estado estrechamente relacionada al cultivo de especies vegetales que le proveen de alimentos para su subsistencia. De hecho, crónicas antiguas de hambrunas, plagas y epidemias, indican que algunas de las más serias enfermedades de plantas como royas, tizones y mohos, ya eran conocidas antes de la emergencia de la agricultura organizada (Jackson y Taylor 1996).

Las enfermedades de plantas ha resultado en pérdidas catastróficas en las cosechas, lo cual a su vez ha producido hambrunas y cambios sociales trascendentes. A pesar de que han surgido varias formas de control o ataque contra las plagas, aún persiste la amenaza de enfermedades epidémicas de plantas, mismas que resultan especialmente peligrosas en aquellas regiones que practican los monocultivos.

Además de los efectos de los hongos patógenos en las cosechas, está también el gran riesgo que constituye la infección de las plantas sobre la salud de

animales y humanos debido a los metabolitos producidos por los hongos. Esta es una consecuencia de la mayor importancia. De acuerdo al efecto de los hongos patógenos a estos dos niveles, la atención a las contaminaciones de granos durante la formación de la semilla en la planta madre o en el almacenamiento post-cosecha ha merecido una gran atención.

1. HONGOS PATOGENOS DE GRANOS

En la naturaleza existen muchas especies de hongos patógenos que parasitan al maíz, frijol, lenteja, arroz y otros granos de primordial interés para el ser humano. Entre los principales géneros se encuentran los siguientes: *Alternaria*, *Fusarium*, y *Helminthosporium*, aunque un gran número de otras especies ha sido encontrado (Bewley y Black 1987), y cada una de ellas muestra un cuadro sintomático específico. A continuación se dan algunos ejemplos de varias enfermedades importantes en plantas, producidas por hongos.

Cuando hay demasiada humedad, *Helminthosporium spp* se desarrolla en los embriones de la semilla y produce la decoloración de su cubierta generando en algunos casos puntos o manchas negras.

Puccinia graminis es un hongo que destruye el tallo de la planta, sus esporas son ampliamente diseminadas por el viento y se adhieren a las hojas de las plantas que parasitan, a las que utilizan como puerta de entrada, ya que producen hifas receptoras que le permiten introducirse en los vasos leñosos y así llegar al tallo (Ayres y col. 1980).

Ustilago maydis es un hongo ampliamente distribuido en todo el mundo y de gran impacto económico. Como su nombre lo indica, parasita generalmente al maíz. Este hongo crece sobre el grano formando una gran masa de hifas induciendo a que el protoplasto se cierre y empaque formando una estructura globosa. Posteriormente puede destruir la flor y reemplazar el grano con masas de esporas

Fusarium graminearum, *F. moniliforme* y *F. saubineti* son especies de hongos que invaden semillas de maíz produciendo inhibición del desarrollo del grano y aún pudrición del mismo. En diferentes momentos del desarrollo de la planta, este género produce lesiones necróticas en hojas y pudrición de tallo, raíz y hojas (Moore-Lander 1990). *Fusarium moniliforme* es un hongo que con gran frecuencia se encuentra en el maíz almacenado. Este hongo sintetiza muchas sustancias tóxicas, entre las que se encuentran la serie de fumonisinas FB1, FB2, FB3, FB4, FA1, FA2 (Wilson y Oehme 1997), la fusarina C y la moniliformina.

Fusarium verticillioide, aparentemente también produce moniliformina, aunque ello depende de las condiciones de cultivo. Así por ejemplo, en los cultivos del hongo procedente de maíz sudafricano contaminado, la moniliformina no aparece.

Fusarium graminearum produce el tricoteceno vomitoxina. El maíz contaminado puede tener hasta 37 ppm de vomitoxina.

Fusarium nivale crece sobre los cereales y en particular las comidas preparadas con arroz contaminado producen mareos y vómitos (Lindner 1995).

Generalmente, todos estos hongos actúan interfiriendo con procesos fisiológicos y metabólicos de la planta, tales como nutrición, entrada y salida de agua, de minerales y iones, respiración, inhibición de la fotosíntesis, etc. (Moore-Lander 1990).

2. MICOTOXINAS

La interacción de los hongos patógenos y sus huéspedes es muy compleja: comprende tanto mecanismos de ataque del hongo que le permiten penetrar en el hospedero, como mecanismos de defensa del hospedero. El balance final entre estas dos estrategias antagónicas lleva a la proliferación exitosa del patógeno, o bien a su fracaso en la invasión del hospedero.

Dentro de las formas de ataque de los hongos hacia su huésped, está la producción de metabolitos secundarios que son secretados en el tejido del hospedero. Entre estos metabolitos están los elicitores y las toxinas. Los elicitores son compuestos de naturaleza polisacárida o peptídica, que tienen receptores específicos en aquellos hospederos que presentan resistencia hacia el hongo. De esta manera, la señal del hongo “recibida” por el hospedero resistente, desencadena en éste una serie de reacciones intracelulares que tiene por objeto la defensa ante el ataque del hongo (Benhamou 1996). Otro gran grupo de metabolitos secundarios producidos por hongos es el de las toxinas. En la

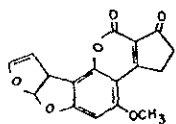
naturaleza existen muchas toxinas de origen fúngico, las hay de muy diversa estructura química y en general son biológicamente activas a concentraciones menores a 10^{-5} M (Desjardins y Hohn 1997). Entre las toxinas de hongos más representativas y mejor conocidas están las siguientes:

Aflatoxinas.- Especies productoras: *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

Etiología y toxicología: Contaminantes naturales en cacahuates, semillas de algodón, nueces de Brasil, maíz y otros frutos; es una potente toxina hepática y cancerígena; la aflatoxina B1 es comúnmente encontrada de forma natural y es la más potente del grupo de las aflatoxinas.

Estructura química de las aflatoxinas: Es un esqueleto hidrofóbico cíclico con varios sustituyentes polares.

B1



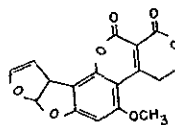
B2



M1



G1



G2



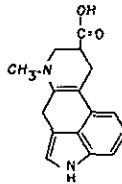
Alcaloides del ergotismo (ergotamina, ergosina) Especie productora:

Claviceps purpurea.

Etiología y toxicología: El hongo parasita el centeno y varias plantas forrajes, ha causado muerte en los animales y el hombre en Europa antes del siglo pasado; el origen fúngico del ergotismo se estableció en 1764.

Estructura química: contiene un grupo ácido, tres anillos insaturados y un anillo cíclico saturado, así como un grupo metilo unido a un nitrógeno.

Alcaloides del ergotismo
(ésteres peptídicos del
ácido lisérgico): ergota-
mina, ergosina, ergocris-
tina, ergocriptina, ergo-
cornina



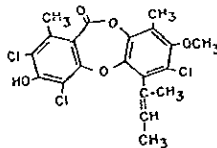
(ácido L-lisérgico)

Nidulina.- Especie productora: *Aspergillus nidulans*.

Etiología y toxicología: El moho está muy distribuido en suelos. El maíz y los cereales contaminados con este organismo producen toxicidad aguda en patos, ratones y ratas.

Estructura química: está integrada por un esqueleto de tres anillos, dos de ellos aromáticos y un heterocíclico, todos ellos contienen varios grupos como metilos, cloros e hidroxilos.

Nidulina

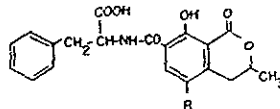


Ocratoxinas.- Especies productoras: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus melleus* y *Aspergillus sulphureus*.

Etiología y toxicología: La ocratoxina A y sus ésteres son hepatotóxicos, produciendo infiltración grasa en las células del parénquima hepático; la ocratoxina B no es tóxica; la ocratoxina A existe de forma natural en el maíz y la cebada.

Estructura química: integrada por tres anillos cíclicos, un ácido, un éster y algunos sustituyentes en los anillos, tales como hidroxilos y cloruros.

Ocratoxinas
A, R = Cl
B, R = H

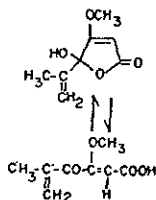


Ácido penicílico.- Especies productoras: *Penicillium puberulum*, *Penicillium martensii*, *Penicillium thomii*, entre otros.

Etiología y toxicología: Contaminante natural de cereales, judías y otros granos con una amplia distribución; la toxina es muy activa y produce síntomas agudos, con propiedades carcinogénicas demostradas.

Estructura química: su estructura se encuentra en equilibrio entre una estructura cíclica y una estructura abierta, contiene varios grupos. Entre los más importantes están los siguientes: un grupo ceto, un alqueno, un ácido, dos metilos y un metoxi.

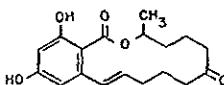
Acido penicilico



Zearalenona.- Etiología y toxicología: Se da de modo natural en los cereales enmohecidos, produce abortos en cerdas y vulvovaginitis.

Estructura química: contiene un esqueleto carbonado cíclico y varios grupos polares como los hidroxilos y los grupos metoxi (Moreno 1983).

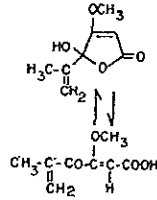
Zearalenona
y macrólidos relacionados



3. FUMONISINA B1

La fumonisina B1 (FB1), es un metabolito secundario producido por *Fusarium moniliforme* y cuya estructura química se aprecia en la Fig. 1.

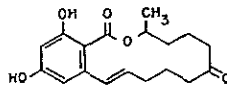
Acido peniclico



Zearalenona.- Etiología y toxicología: Se da de modo natural en los cereales enmohecidos, produce abortos en cerdas y vulvovaginitis.

Estructura química: contiene un esqueleto carbonado cíclico y varios grupos polares como los hidroxilos y los grupos metoxi (Moreno 1983).

Zearalenona
y macrólidos relacionados



3. FUMONISINA B1

La fumonisina B1 (FB1), es un metabolito secundario producido por *Fusarium moniliforme* y cuya estructura química se aprecia en la Fig. 1.

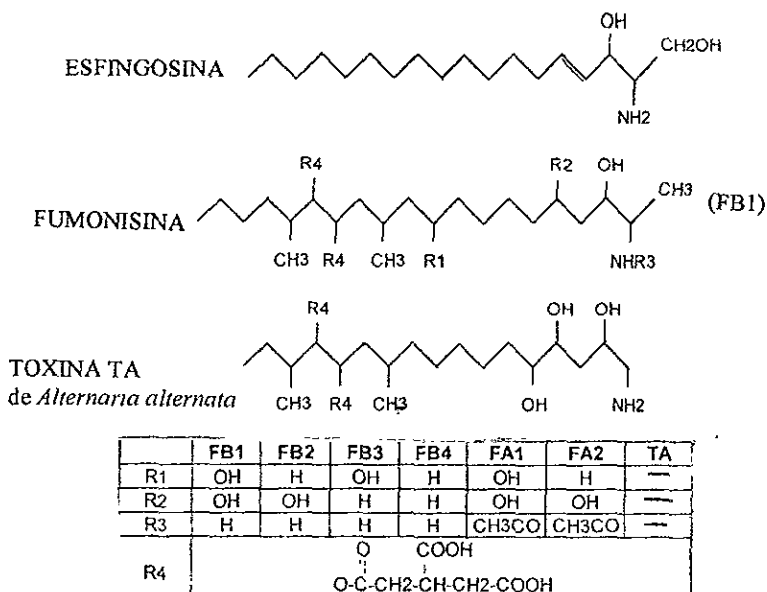


Figura. 1. Estructura de toxinas análogas de la esfingosina entre las que se encuentra la FB1 (Thibault 1997).

Su estructura fue elucidada por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas en 1988 (Bezuidenhout y col. 1988). La FB1 no tiene una forma geométrica definida, presentándose como un sólido amorfo (Gelderblom y col. 1988), su peso molecular es de 722 g/mol y su punto de fusión está dado entre 103 y 105 °C (Dupuy 1994). La FB1 es soluble en agua, metanol ó acetonitrilo, e insoluble en solventes no polares. La toxina no absorbe la luz UV ni la luz visible, en cambio, sí absorbe en el rango del infrarrojo dando varios picos de absorción máxima a 3450, 2934, 1729 y 1632 cm^{-1} (Scott 1993). La FB1 se puede hidrolizar tanto en medio ácido (6 M de HCl) como básico

(0.05 a 2 M de KOH), liberando dos residuos de ácido propan- tricarbóxico y un aminopoliol respectivamente (Scott 1993). La FB1 es termoestable y los procedimientos termoquímicos actualmente utilizados para esterilizar los alimentos son *insuficientes* para destruirla (Dupuy 1994, Dupuy y col. 1993).

3.1 Efectos en plantas, animales y humanos.

A nivel molecular han sido descritos algunos blancos de algunas toxinas en las células del hospedero. Resulta lógico pensar que una de las primeras interacciones entre el microorganismo y el hospedero está dada a nivel de sus paredes celulares y sus membranas plasmáticas. No obstante, la literatura a este respecto es más bien exigua. En las plantas, la FB1 daña las hojas, produciéndoles un color amarillo (clorosis), debido a que inhibe la producción de clorofila. La FB1 también interfiere con procesos fisiológicos normales de la planta, tales como nutrición y respiración, dañando a los tejidos y produciendo alteraciones de los canales iónicos, lo cual ocasiona la salida de iones tales como el K^+ (Moore, 1990).

Por lo que respecta a los animales, debido a que *Fusarium moniliforme* y algunos de sus metabolitos entre ellos la FB1, se encuentran ampliamente diseminados en el mundo y sobre todo contaminando al maíz, es fácil suponer que la FB1 se encuentra involucrada en muchas afecciones toxicológicas y patológicas que afectan a diferentes especies animales (Voss, 1990). Aún cuando

la FB1 ha sido recientemente aislada y purificada, la literatura sobre la toxicidad de éste compuesto ha ido en aumento, por lo que ahora se tienen muchos estudios confiables (Thibault y col. 1997).

Marasas y Kellerman en 1988 reprodujeron la equinoleucoencefalomalacia usando FB1 purificada. La muerte de los caballos fue inducida haciendo comer a los animales maíz contaminado con FB1 a una concentración de 8 ppm.

Recientes descubrimientos usando FB1 purificada han confirmado que es la causante de edema pulmonar en cerdos (Harrison y col. 1990). La hepatocarcinogénesis ha sido inducida en la rata usando FB1 (Gelderblom y col. 1991, Gelderblom y col. 1992). Asimismo, se ha visto que esta sustancia produce lesiones renales en el ratón, rata y oveja y cirrosis y fallas del corazón en mandriles (Kriek y col. 1981, Voss y Norred 1992). En estudios llevados a cabo con pollos se observó que la FB1 incrementa la susceptibilidad a infecciones bacterianas (Chatterjee y Mukherjee 1994). Por lo que respecta a los seres humanos, estudios epidemiológicos llevados a cabo en Sudáfrica y China mostraron que hay una relación directa entre el consumo de maíz contaminado con altos niveles de FB1 y el cáncer esofágico (Rheeder y Marasas 1992, Sydenham y col. 1992).

4. MEMBRANA PLASMÁTICA

4.1 Composición y estructura química.

Las membranas biológicas son arreglos de moléculas de alto peso molecular muy estructurados, estables y complejos, que además tienen una gran dinámica que les permite tener un papel activo esencial en la fisiología celular. Los principales componentes de la membrana plasmática son lípidos, proteínas y carbohidratos. Entre los principales lípidos se encuentran los esteroides, glicolípidos y fosfolípidos. El glucocerebrósido es el glicolípido que se encuentra en mayor proporción en las plantas, mientras que del grupo de los esteroides, los esteroides libres son los que aparecen en mayor cantidad, en tanto que la fosfatidilcolina es el compuesto más representativo de los fosfolípidos (Larsson y col. 1988).

La estructura actualmente aceptada de la membrana plasmática es la que propusieron Singer y Nicholson en 1972. El modelo del “mosaico fluido” consta de una estructura básica, compuesta de una bicapa de lípidos fluida y flexible, en la que se hallan inmersas proteínas de dos tipos: integrales y periféricas (Fig. 2). Las proteínas integrales se encuentran completamente embebidas en la bicapa, mientras que las proteínas periféricas se encuentran parcialmente embebidas en ella (Devlin 1997). Las moléculas lipídicas son anfipáticas, es decir que tienen un extremo hidrófilico muy polar y otro hidrófobico no polar. Las cabezas hidrófobicas formadas por las cadenas de los ácidos grasos de los lípidos están dirigidas hacia el

interior de la bicapa, mientras que los extremos hidrófilos (cabezas polares) están orientados hacia el exterior.

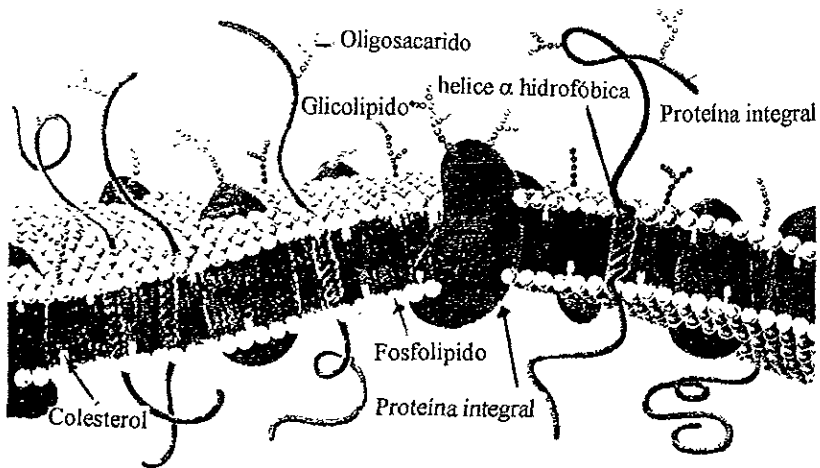


Fig. 2. Modelo del mosaico fluido de las membranas biológicas (Voet y Voet 1995).

Las proteínas periféricas poseen grupos hidrófilicos en su superficie que se hallan unidos por atracción electrostática a las cabezas polares con carga eléctrica de los lípidos, mientras que las proteínas integrales poseen en su superficie grupos hidrófobos de los aminoácidos, lo que hace que estén embebidas en la porción central hidrófobica de la bicapa.

4.2 Funciones de la membrana plasmática.

- Actúa como barrera semipermeable, permitiendo que algunas moléculas penetren y salgan de la célula a través de proteínas específicas que forman poros o bien que

translocan solutos. Los solutos que son transportados de esta manera son en general moléculas hidrofílicas, con carga eléctrica, o bien de gran tamaño. Además, la membrana plasmática mantiene relativamente constante el medio ambiente interno celular con respecto al exterior al mantener condiciones fisiológicas constantes, como pH, concentración de K^+ y Na^+ .

- Proporciona el sitio de soporte de proteínas con catálisis enzimática, ya que muchas enzimas vitales para la célula se encuentran incrustadas en ella. Muchas de estas enzimas están relacionadas con la formación de productos propios del espacio apoplástico, incluyendo los de pared celular (Fig. 3).
- Puede ser usada para empacar materiales moleculares que irán a integrarse a otros sitios de la célula y que algunas veces, se exportan en procesos de secreción.
- Las membranas contienen receptores, los cuales sirven para detectar señales externas, que tienen que ser atendidas por la célula y ante las que tiene que expresar una respuesta.

5. PAPEL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA INTERACCIÓN CON PATÓGENOS

Durante la invasión fúngica muchas interacciones complejas ocurren con el hospedero, dando como resultado el desarrollo de los síntomas de la

translocan solutos. Los solutos que son transportados de esta manera son en general moléculas hidrofílicas, con carga eléctrica, o bien de gran tamaño. Además, la membrana plasmática mantiene relativamente constante el medio ambiente interno celular con respecto al exterior al mantener condiciones fisiológicas constantes, como pH, concentración de K^+ y Na^+ .

- Proporciona el sitio de soporte de proteínas con catálisis enzimática, ya que muchas enzimas vitales para la célula se encuentran incrustadas en ella. Muchas de estas enzimas están relacionadas con la formación de productos propios del espacio apoplástico, incluyendo los de pared celular (Fig. 3).
- Puede ser usada para empacar materiales moleculares que irán a integrarse a otros sitios de la célula y que algunas veces, se exportan en procesos de secreción.
- Las membranas contienen receptores, los cuales sirven para detectar señales externas, que tienen que ser atendidas por la célula y ante las que tiene que expresar una respuesta.

5. PAPEL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA INTERACCIÓN CON PATÓGENOS

Durante la invasión fúngica muchas interacciones complejas ocurren con el hospedero, dando como resultado el desarrollo de los síntomas de la

enfermedad en la planta. Dos clases de ataques químicos son de interés primordial. Primero, la liberación de enzimas fúngicas de alto peso molecular que van a degradar la pared celular del hospedero (Fig. 4), lo cual conduce a la maceración del tejido y, segundo, la liberación de toxinas fúngicas de bajo peso molecular, las cuales interaccionan con los componentes de la membrana de la célula hospedera alterando su estructura y función e iniciando lo que más tarde conducirá a la enfermedad y/o muerte celular (Knogge 1998).

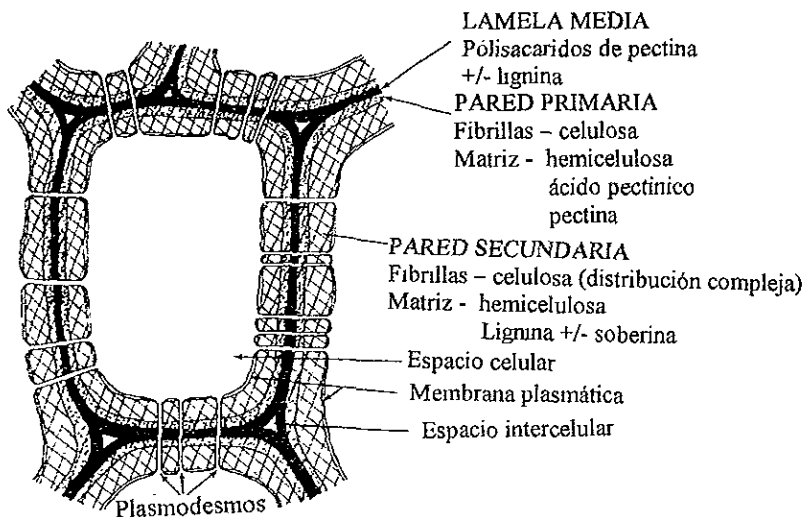


Figura. 3. Diagrama de la estructura de la pared celular (Isaac 1992).

La naturaleza química de los compuestos producidos por el hongo patógeno es fundamental para determinar su interacción con la membrana plasmática del hospedero, ya que, como se ha señalado anteriormente, las membranas biológicas están constituidas por compuestos anfipáticos cuyas superficies son

altamente polares o por lo menos hidrofílicas, mientras que el centro es altamente hidrofóbico. Como consecuencia de estas propiedades, aquellos compuestos producidos por el patógeno podrán penetrar la membrana si tienen características anfipáticas, o únicamente entrarán en un contacto polar o electrostático con las cabezas de los fosfolípidos, si es que la naturaleza del compuesto es polar. El tamaño del compuesto también participa, aunque en menor magnitud, en sus propiedades de permeabilidad en las membranas biológicas (Isaac 1992).

Las toxinas de los hongos patógenos interactúan con la membrana o componentes de ésta, produciendo varios efectos fisiológicos. Entre los más conocidos están los siguientes: una toxina puede producir cambios fisiológicos en la membrana, induciendo un incremento rápido en la permeabilidad electrolítica, asimismo puede producir cambios en el potencial de membrana y en la respiración celular junto con un decremento en la síntesis de proteínas. Un ejemplo de este efecto es el de la toxina victorina ó toxina HV producida por el hongo *Helminthosporium victoriae* (Isaac 1992). Otras toxinas causan destrucción de la membrana. Un ejemplo de ellas es la toxina AM, producida por *Alternaria mali* (Isaac 1992). La toxina AK sintetizada por *Alternaria alternata* induce la salida específica de iones a través de la membrana plasmática, particularmente K^+

y fosfato, de una manera muy rápida. Esto da como resultado una reducción en el potencial de membrana y puede iniciar la necrosis celular (Isaac 1992).

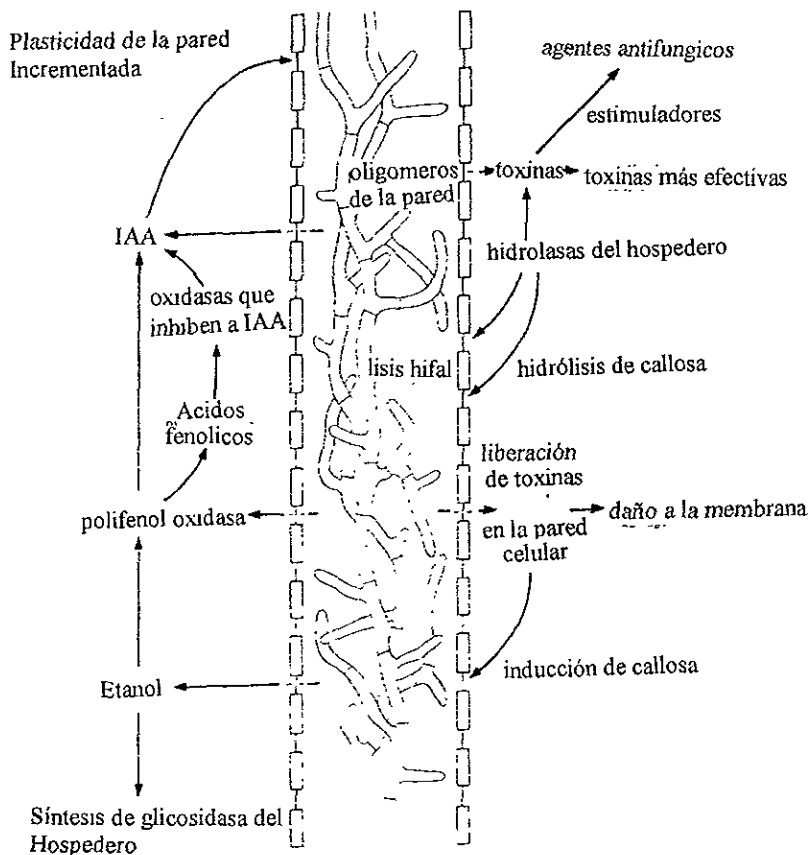


Figura. 4. Diagrama resumido que muestra la interacción entre el hospedero y las reacciones metabólicas fúngicas en la patogénesis vascular (Pegg 1985).

A nivel molecular y gracias a sus estructuras químicas, las toxinas pueden tener afinidad por ciertos componentes de la membrana plasmática, ya sea los lípidos membranales, ó proteínas específicas. Se ha descrito que algunas toxinas pueden alterar el proceso de transporte transmembranal, en particular por la

alteración de la actividad de la bomba de H^+ , que es una ATPasa transmembranal. Debido a que esta proteína produce un gradiente electroquímico de H^+ que impulsa el transporte de muchos solutos y nutrientes a través de acarreadores y canales específicos, cualquier factor que altere el funcionamiento de esta ATPasa, puede tener efectos en el transporte de solutos de la célula. Muchas toxinas disminuyen la actividad de esta enzima, como es el caso de las beticolinas de *Cercospora beticola* (Simon-Plas 1996). Otras la estimulan, un ejemplo de esta toxina es la fusicoccina, producida por *Fusicoccum amygdali*. Esta toxina también afecta la fluidez de la membrana (Yin y col. 1996).

6. DEPOSICION DE CALLOSA

Una de las formas de defensa de la célula hospedera ante el ataque de patógenos, es la producción de sustancias que contribuyen a darle resistencia mecánica a la célula. Una de estas sustancias es la callosa (Kauss 1987, Kauss 1989). La callosa consiste principalmente de una red de cadenas lineales de glucanas con enlaces β -1,3 (Fig. 5) Una función adicional de éste polímero es cerrar las conexiones que unen a los protoplastos de células contiguas o vecinas.

La 1,3- β -D glucan sintetasa es la enzima que se encarga de sintetizar la callosa, por lo tanto, todos los factores que inhiban o alteren a esta enzima van a afectar la deposición de esta glucana. En estudios experimentales se ha visto que

esta enzima es activada por Ca^{++} y enzimas proteolíticas tales como la tripsina (Kauss y col. 1983).

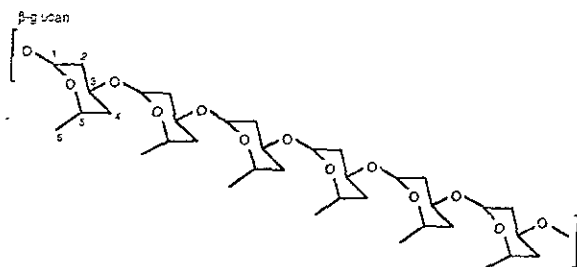


Fig. 5. Estructura de la 1,3-β-glucana, también conocida como callosa.

La deposición de callosa se lleva a cabo muy rápidamente en ciertos sitios (algunas veces en minutos), especialmente en los lugares de penetración, cuando la célula es dañada mecánicamente o atacada por patógenos (Currier 1957, Fincher y Stone 198, Bell 1981, Girard y MacLachlan 1987). En consecuencia, la callosa y la velocidad a la cual es formada son importantes parámetros de reparación celular y de mecanismos de resistencia a enfermedades (Fig. 6). La callosa es también depositada frecuentemente cuando la estructura de la pared sufre alteraciones en ciertos estados del desarrollo, por ejemplo, durante la maduración del polen. La deposición de callosa puede ser evaluada por cuidadosas observaciones microscópicas. Asimismo, son utilizados otros

métodos tales como ensayos citoquímicos, fluorescencia empleando anilina, determinación fluorométrica, y la más común y utilizada en esta tesis, el ensayo con el sustrato UDPG, marcado radioactivamente con ^3H .

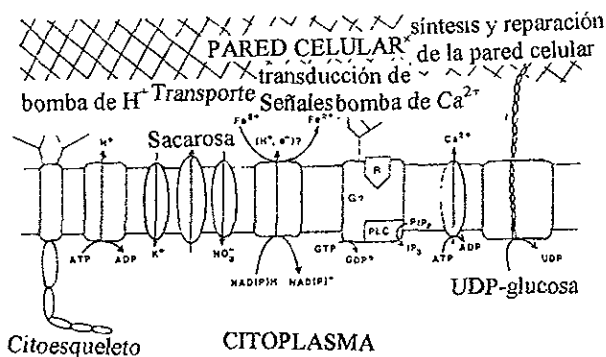


Fig. 6. Esquema de las reacciones en las que participan las proteínas de la membrana plasmática (las estructuras ramificadas representan carbohidratos, R = receptor, PLC = Fosfolipasa C (Larsson y col. 1988).

7. 1,3- β -D GLUCAN SINTETASA

La 1,3- β -D- glucan sintetasa (EC 2.4.1.34), es una enzima encontrada en la mayoría de las plantas superiores ó complejas, que se localiza tanto en las membranas plasmáticas, como en la membrana de algunos organelos tales como el aparato de Golgi. La enzima que se localiza en el aparato de Golgi se llama

Glucan sintetasa I (GS I), mientras que la que se encuentra en la membrana celular ó plasmática se le conoce como Glucan sintetasa II (GS II). Las principales diferencias entre la GS I y la GS II son las siguientes: la GS I es ensayada usando concentraciones micromolares de UDPG en la presencia de 10 mM de Mg^{2+} , su actividad puede perderse en el "pellet" y al momento de resuspenderse éste, así que con frecuencia es ensayada en las fracciones de los gradientes de centrifugación. En cambio, la GS II es activada por concentraciones de UDPG mayores a 10 μ M y es ensayada usando 0.1 mM de UDPG, sin Mg^{2+} , además su actividad depende de la presencia del azúcar libre.

La GS II es la enzima de interés en éste trabajo. Los estudios que se han realizado para purificar esta enzima hacen uso de detergentes tales como la digitonina, el octil- β -glucósido y el CHAPS (3-[(3-Colamidopropil dimetil amonio] 1-propan-sulfonato), estos se utilizan para solubilizar a la enzima y después extraerla de las vesículas de membrana plasmática (Henry y Stone 1982, Meikle y col. 1991).

Hasta el momento se han hecho varios intentos por dilucidar su estructura terciaria, pero a pesar de los esfuerzos desplegados, aún no se logra determinar y esto se debe a la naturaleza lábil de la enzima y a su susceptibilidad e inactivación por muchos detergentes, entre otros factores (Dhugga y col. 1991).

Los trabajos que se han realizado para determinar su estructura generalmente se han hecho con anticuerpos monoclonales purificados y técnicas cromatograficas. Un trabajo reportado y en el que se hizo uso de anticuerpos monoclonales y células de *Lolium multiflorum*, se analizó el inmunoprecipitado del complejo de glucan sintetasa II en un soporte de gel de dodecilsulfato de poliacrilamida y se encontraron cuatro polipéptidos con aparente masa molecular de 30, 31, 54 y 58 kDa junto con diversos componentes menores. Asimismo se ha observado que este complejo de glucan sintetasa es capaz de sintetizar 1,3-glucana, aún más, usando un compuesto fotoreactivo muy semejante a la UDPG, el 5-[3-(p-azidosalicilamida)] alil-uridin 5'-difosfoglucosa, se ha visto que esta sustancia se une al polipéptido de 31kDa, y que cuando se agrega el UDPG al complejo enzimático y después se agrega el compuesto fotoreactivo, éste ya no se adhiere al polipéptido de 31kDa, lo que sugiere que el sitio activo de la enzima se localiza en el polipéptido de 31 kDa (Meikle y col. 1991, Fink y col. 1990, Kamat y col. 1992, Kuribayashi y col. 1993). Por otro lado, se ha reportado la existencia de un polipéptido de 55 kDa, obtenido por inmunoprecipitación con anticuerpos selectivos a la glucan sintetasa II de membranas de chicharo y que se le ha asociado a la 1,3- β -glucan sintetasa, este polipéptido tiene su punto isoeléctrico a pH 5.1 (Dhugga y Ray. 1991)

La GS II se localiza más específicamente en la cara intracelular de la membrana plasmática (Fincher y Stone 1981, Eschrich 1975) y es la encargada de enlazar monómeros de glucosa para formar una cadena lineal de glucana con enlaces 1,3- β . Los polímeros se van a depositar en la parte extracelular de la membrana, esto es, en la región de la pared celular. La deposición ocurre rápidamente cuando el tejido es sometido a daños mecánicos o es atacado por organismos patógenos (Van Der Woude 1974, Bowles y col. 1972, Eisinger y Ray 1972, Hardin y col. 1972, Shafizader y col. 1973, Wooding 1968). La generación enzimática de la 1,3- β -glucana parece estar controlada por factores endógenos que activan o inhiben la actividad de la glucan sintetasa. De acuerdo con estudios realizados *in vitro*, se ha observado que la glucan sintetasa es muy activa en preparaciones de membrana de una gran variedad de tejidos (Kauss y col. 1983). Asimismo, se ha observado que algunas enzimas proteolíticas como la tripsina, y el ión Ca^{++} a ciertas concentraciones ($>10^{-7}\text{M}$), activan y estimulan a la enzima. También se ha visto que ciertos compuestos y iones inhiben a la glucan sintetasa, en la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos.

Tabla 1. Compuestos inhibidores de la enzima 1,3 β -D glucan sintetasa de la membrana plasmática (GS II).

compuesto	concentración
Calmidazolio	100 μ M
Trifluoroperazina	200 μ M
Polimixina B	450 mM
NaF	45 mM
KF	45 mM
NaCl	45 mM
KCl	45 mM

Finalmente, debe recalcar que la GS II es considerada un marcador de membrana plasmática de plantas, debido a que se encuentra distribuida de manera exclusiva en esta membrana (Morré y Snadelius 1990).

ANTECEDENTES INMEDIATOS

La fumonisina B1 es un metabolito secundario producido por el patógeno *Fusarium moniliforme* y como tal puede provocar respuestas de defensa en la célula del hospedero. Una de las respuestas al ataque de patógenos es la

formación de callosa, misma que se produce por la actividad de la 1,3- β - glucan sintetasa (GS II).

HIPOTESIS

Si la glucan sintetasa II induce la formación de callosa y esta formación es un mecanismo de defensa frente a patógenos, entonces, la FB1 puede afectar directamente a la actividad de la GS II.

OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar el efecto de la FB1 en la actividad de la 1,3- β -glucan sintetasa de embriones de maíz en germinación.
2. Determinar la relación entre la actividad de la 1,3- β -glucan sintetasa y la inducción de respuesta de defensa.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz con 24 h de germinación
2. Determinar las condiciones óptimas de actividad de la 1,3- β -glucan sintetasa en vesículas de membrana plasmática purificadas de embriones de maíz germinados 24 h.

3. Determinar el efecto *in vitro* de la FB1 sobre la actividad de la 1,3- β -glucan sintetasa añadiendo la toxina directamente a las vesículas de membrana plasmática.
4. Determinar el efecto *in vivo* de la FB1 sobre la actividad de la 1,3- β -glucan sintetasa en vesículas de membrana plasmática, extraídas de embriones imbibidos en presencia de la toxina.

MATERIALES Y METODOS

1. Material biológico.

Se utilizaron embriones de semillas de maíz maduras y secas de la variedad Chalqueño (obtenidas en Chalco, Edo de México), los cuales fueron extraídos manualmente con la ayuda de una navaja de un solo filo. Estos se almacenaron en refrigeración hasta el momento de ser usados. Los embriones tienen una integridad estructural y funcional, evidenciada por tener un 95% de germinación y ser teñidos por el colorante azul de tripano (Sánchez-Nieto y col. 1998).

2. Imbibición de embriones.

De 13 a 16 gramos de embriones se colocaron sobre papel filtro previamente humedecido con 18 mL de solución de imbibición diluido 1:3 (6 mL de solución con 12 mL de agua, ver apéndice), en cajas Petri estériles. Se incubaron a 29°C durante 24 horas en ausencia o presencia de FB1 (20 μ M). Al

concluir el tiempo de incubación, los embriones se congelaron con nitrógeno líquido hasta su homogeneización.

3. Extracción de la fracción microsomal.

Los embriones embebidos se colocaron en una licuadora, se les añadió amortiguador de homogeneización (ver apéndice) en una relación 2 a 1 y se molieron a baja velocidad por 10 segundos. La suspensión resultante se filtró a través de cuatro capas de gasa (previamente humedecida con agua) y el homogeneizado se centrifugó a 3000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C (rotor 11500 MAXI). Se eliminó la capa de grasa que quedó en la parte superior y con la ayuda de una pipeta pasteur se tomó con cuidado el sobrenadante. Este sobrenadante se centrifugó a 11000 r.p.m. por 10 minutos (rotor 11500 MAXI). En este paso se eliminaron las mitocondrias, las cuales quedaron en el "pellet" y el sobrenadante se centrifugó nuevamente, pero ahora a 70000 r.p.m. por 1.5 h a 4°C (rotor Beckman 60 Ti). El botón obtenido, se resuspendió en un volumen pequeño de amortiguador de ajuste de peso (ver apéndice), en esta fracción se encuentran membranas de varios organelos y la cual se denomina fracción microsomal.

4. Obtención de una preparación enriquecida en membranas plasmáticas.

Se adicionaron 25 mg de proteína microsomal a una mezcla de fases (ver apéndice) de 8.1 g de peso. Se añadió solución de ajuste de peso para alcanzar un

peso de 10.8 g entre mezcla de fases y membranas. Después se mezcló por inversión de 20-30 veces y se centrifugó a 1500 r.p.m. por 5 minutos (rotor 11500 MAXI); se recuperó la fase superior (fase U1). Posteriormente la fase U1 se adicionó a la fase de dextran de un sistema de fases de 10.8 g, en el cual se ajustó el peso con agua y no con la adición de membranas. Se volvió a centrifugar a 1500 r.p.m. por 5 minutos (rotor 11500 MAXI) y se recuperó la fase superior (fase U2). Se procedió a lavar la fracción superior, diluyendo con una relación de 4 volúmenes de amortiguador de lavado por un volumen de la fracción superior, se mezcló bien y se centrifugó por 1.5 h a 30000 r.p.m (rotor Beckman 60 Ti). El botón obtenido se resuspendió en un volumen pequeño de amortiguador de lavado y se almacenó en alícuotas a -70°C hasta su uso.

5. Determinación de la actividad de la 1,3- β - glucan sintetasa.

Se preparó la mezcla de reacción que se menciona más adelante, a la cual se le adicione la proteína membranal.

Mezcla de reacción: Tris/HCl 50 mM pH 7.0, Sacarosa 330 mM, Digitonina 0.006%, glicerol 16%, DTT ó DTE 2 mM, Espermina 2 mM, CaCl_2 0.2 mM, MgCl_2 10 mM, EGTA 4 mM, UDPGlucosa 2 mM, UDPG-[^3H] glucosa 200Bq/mol. Esta mezcla está a una concentración del doble de la concentración final, recomendada para medir la actividad enzimática.

Se colocaron 50 μL de la mezcla de reacción concentrada en un tubo eppendorf al cual se adicionó el volumen necesario de agua destilada. Finalmente se adicionó el volumen necesario de la proteína membranal (de acuerdo a la cantidad de proteína que se desea ensayar y que se indica en cada experimento), de tal manera que el volumen final fuera de 100 μL .

Esta mezcla de reacción se realizó para todos los ensayos de actividad y solo se suplementó con concentraciones variables de FB1 entre 5 y 20 μM ó de proteína membranal según se indique en cada experimento. La reacción se inició al agregar la proteína de membrana a la mezcla de reacción, pudiéndose manejar diversos tiempos de incubación a 25° C, como se indica en cada experimento. La reacción se detuvo agregando a la mezcla de reacción 350 μL de solución de UDPG 2 mM en etanol frío al 70%. Posteriormente, a los tubos eppendorf que contenían la mezcla de reacción, se les transfirió a una pequeña cámara que sirve para guardar material radioactivo, se taparon bien y se mantuvieron en el congelador a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se sacaron los tubos eppendorf del congelador y con la ayuda de una micropipeta, el volumen de cada tubo fue cuidadosamente transferido a filtros de papel Wathman 3M de aproximadamente 1cm de diámetro perfectamente etiquetados. Se esperó a que secan completamente a temperatura ambiente ó bien con la ayuda de una secadora de pelo para acelerar el secado. Posteriormente se lavo con una

solución (ver apéndice) para eliminar el UDPGlucosa marcada radiactivamente que quedo libre, finalmente los círculos de papel fueron transferidos a viales de 20 mL correctamente etiquetados y que contenían 4 mL de líquido de centelleo (ver apéndice) para determinar la adioactividad incorporada en un contador de centelleo. Se utilizó el equipo Scintillation Counter Beckman Modelo L 6500 del Laboratorio 306 del Instituto de Fisiología Celular.

6. Determinación de proteína.

Se determinó la concentración de proteína en las diferentes fracciones subcelulares por el método de Lowry modificado por Peterson (1977), ver apéndice.

7. Pruebas estadísticas.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado, con cada punto por triplicado. Los datos experimentales se analizaron para obtener la media, desviación estándar y la regresión lineal cuando fue pertinente.

RESULTADOS

Para lograr los objetivos planteados, se diseñó un protocolo experimental que consistió principalmente del manejo básico de tres técnicas Bioquímicas: aislamiento de VMP, determinación de proteína (Lowry modificado por Peterson) y determinación de la actividad enzimática de la glucan sintetasa (GS II).

1. AISLAMIENTO DE VESICULAS DE LA FRACCION MICROSOMAL Y DE LA MEMBRANA PLASMATICA Y SU PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

En este trabajo se utilizaron dos preparaciones membranales: la fracción microsomal (FM) y la fracción de membrana plasmática (MP). Ambas preparaciones se obtuvieron de embriones de maíz embebidos en ausencia o presencia de FB1. Después de llevar a cabo el procedimiento para obtener las vesículas de la fracción microsomal y de membranas plasmáticas, se determinó la concentración de proteína total obtenida en ambos casos, por el método de Lowry modificado por Peterson. En la Tabla 2 se muestran los resultados que indican que cuando se preparó la FM de embriones embebidos sin FB1, se obtuvo casi 2-3 veces más de proteína que de los embriones embebidos en 20 μ M de FB1. Análogamente, el rendimiento en proteína de la fracción de MP fue de aproximadamente 2 veces más en los embriones control que la de los embebidos con FB1. Por otra parte, se recuperó el 35.5% de proteína de MP a partir de la FM de embriones control, mientras que de los

embriones embebidos con 20 μ M de FB1, se recuperó el 36.2% de proteína de la fracción de MP, que es prácticamente lo mismo.

Tabla 2. Efecto de la FB1 sobre el Rendimiento de Membranas obtenidas a partir de embriones de maíz. Los embriones de maíz (de 14 a 33 g) se embebieron en medio sin ó con 20 μ M de FB1 por 24 h, al cabo de los cuales se obtuvieron las fracciones microsomales (FM) y de membrana plasmática (MP) como se describe en Materiales y Métodos

Preparación	mg prot FM/g embrión	(%)	mg prot. MP/g embrión	(%)
Control	3.78	(100)	1.34	(35.5)
+ FB1	1.93	(100)	0.70	(36.2)

2 OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA 1,3- β -GLUCAN SINTETASA.

La búsqueda de las condiciones óptimas para medir la actividad de la 1,3- β -glucan sintetasa incluyó: tiempo de incubación, cantidad (mg) de proteína de VMP a ensayar y concentración de UDPGlucosa-³H. Para determinar la cantidad de vesículas de MP, se probaron tres condiciones: 40, 50, y 100 μ g. En estos experimentos se observó que las cantidades de proteína ensayados, generaban valores de cuentas por minuto de aproximadamente 1000 (Tabla 3), lo cual se consideró satisfactorio. Si bien, en estas condiciones experimentales no se encontraba una relación lineal entre el número de cpm y la cantidad de proteína, la incorporación de marca al polímero estaba muy por arriba de los blancos (~100). Por ello se determinó trabajar con 40 μ g de VMPs para los siguientes experimentos, con el objetivo

de economizar membranas y realizar suficientes experimentos para realizar el análisis estadístico.

Tabla 3. Relación entre la cantidad de proteína membranal y la incorporación de sustrato radioactivo incorporado.

μg de proteína	cuentas por minuto (cpm)
40	750
50	850
100	1330

Posteriormente se exploró el tiempo de medición de la actividad de la enzima para encontrar el tiempo óptimo de reacción. Para ello, se mantuvieron la temperatura de incubación a 25°C, la concentración de UDPGlucosa-³H (2 mM) y 40 μg de vesículas de MP. El tiempo de incubación con el UDPG y por tanto de la actividad de la 1,3- β -glucan sintetasa, fue de 30 a 90 min. Los primeros experimentos se realizaron con la fracción microsomal para determinar la actividad de la GS II que pudiera existir y poder compararla con los resultados en los que se emplearan vesículas de MP ya purificadas a partir de la FM. Los resultados se muestran en las Figs. 7A y 7B.

Se encontró que durante los primeros 75 minutos hubo incremento lineal en actividad ($\mu\text{mol mg}^{-1}$) con respecto al tiempo. Sin embargo, la linealidad no se mantiene a los 90 minutos de reacción, en donde la actividad, muestra ya un ligero descenso (Fig. 7A). Por otro lado cuando se grafica la

actividad ($\mu\text{mol h}^{-1}\text{mg}^{-1}$) a los diferentes tiempos empleados (Fig. 7B), se hace evidente que la GS II mantiene la misma velocidad de formación de la glucana entre 30 y 70 min, y que a los 90 minutos la velocidad decreció alrededor de un 17%, lo cual es estadísticamente significativo.

La Fig. 7B representa la actividad específica de la GS II. En ésta se observó una clara tendencia a una línea horizontal pero solo hasta los 70 minutos y después de este tiempo tiende a disminuir la actividad. Se observó que la actividad osciló entre 3.5 y 4.5 $\mu\text{mol UDPGlucosa inc h}^{-1}\text{.mg}^{-1}$. Al igual que en la Fig. 7A, cada punto en la gráfica se obtuvo del promedio de tres experimentos independientes.

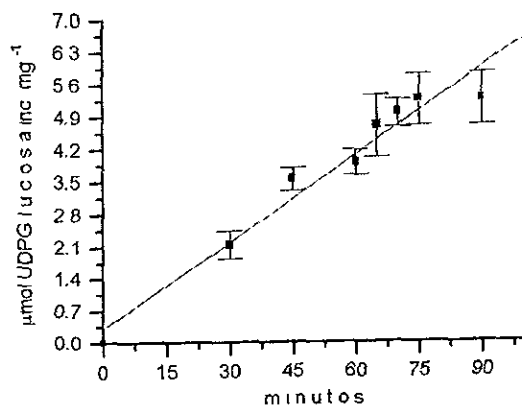


Fig. 7A. Velocidad de la GSII de la fracción microsomal. Cuarenta μg de proteína microsomal se añadieron al medio de reacción y se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para determinar la cantidad de UDPG-lucosa incorporada a glucana, según se describe en *Materiales y Métodos*.

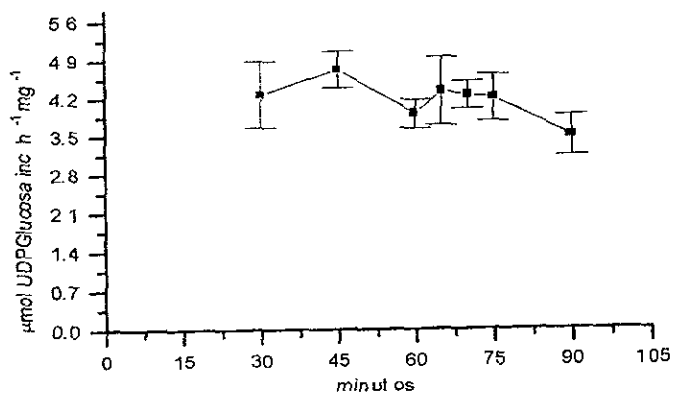


Fig. 7B. Actividad específica de la GSII a diferentes tiempos de la reacción enzimática. Los puntos experimentales se derivan del experimento de la Fig. 7A.

En las mismas condiciones de los experimentos anteriores, se ensayó con proteína de las vesículas de MP para determinar la actividad de la GS II, esperando que ésta fuera mayor con respecto a la de la fracción microsomal, la cual contiene no solo proteínas de la MP sino de otros organelos membranales. Los resultados se muestran en las Figs. 8A y 8B.

En la Fig. 8A se observó con mucha claridad la proporcionalidad entre la velocidad de consumo del UDPG y el tiempo de reacción, además como era de esperarse, la velocidad de incorporación de la glucosa, fue 2 veces mayor con respecto a la de la fracción microsomal, ya que en el intervalo de 30 a 90 minutos la velocidad se incrementó desde 5 a 11 $\mu\text{mol UDPGlucosa incorporada mg}^{-1}$, mientras que en la fracción microsomal en el mismo periodo de tiempo la velocidad se incrementó desde 1.8 a 5 unidades aproximadamente.

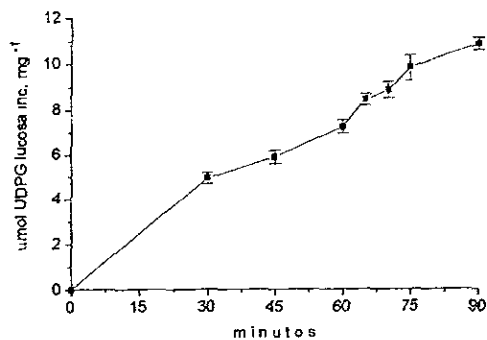


Fig. 8A. Velocidad de la reacción de la GS II de VMP. Cuarenta µg de proteína de membrana plasmática se añadieron al medio de reacción y se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para medir la cantidad de UDPGlucosa incorporada a la glucana según se describe en Materiales y Métodos.

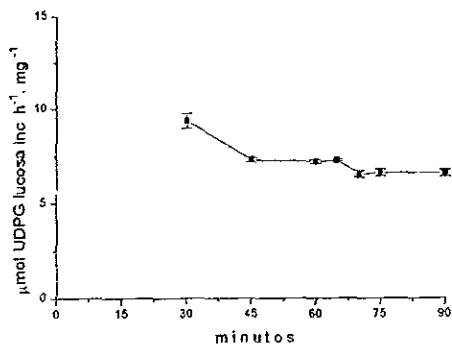


Fig. 8B. Actividad específica de la GSII durante el tiempo de la reacción. Los puntos experimentales se derivan del experimento de la Fig. 8A

La Fig. 8B muestra que la actividad específica de la GS II contenida en las VMP, permanece constante en el transcurso del tiempo. También hay que hacer notar que aunque la actividad de la enzima en las VMP no fue muy superior a la de la fracción microsomal, sí se aprecia un incremento de aproximadamente el doble de actividad.

De acuerdo a los resultados obtenidos, variando el tiempo de incubación se encontró que en el intervalo de 60 a 90 minutos prácticamente la actividad de la glucan sintetasa es la misma, por lo que resulta indistinto utilizar cualquier tiempo de incubación en este intervalo para los siguientes experimentos. Debido a ello, se decidió emplear un tiempo intermedio, esto es, 60 minutos para los siguientes experimentos. De esta manera, se puede usar una baja cantidad de proteína y todavía tener una buena incorporación de sustrato marcado por arriba de la del blanco.

Otra condición probada fue el empleo del detergente BRIJ para los siguientes experimentos, ya que se sabe que este detergente tiene la propiedad de permeabilizar la membrana. De esta manera, si parte de las vesículas de MP fueran selladas de manera correcta, no tendrían la GS II accesible al sustrato y con la introducción del BRIJ, este podría hacer el sustrato accesible a la enzima y con ello veríamos una alta actividad. En presencia de Brij hubo una actividad inicial ($t = 0$) de GS II menor en ausencia de detergente. Por otro lado, la actividad disminuyó aún más, al avanzar el tiempo de reacción, por lo tanto se decidió suspender el uso de Brij.

Tabla. 4 Resultados de la actividad específica de la GS II a diferentes tiempos de reacción.

Tiempo de reacción (minutos)	actividad específica($\mu\text{mol/h/mg}$)	
	con BRIJ	sin BRIJ
0	0	0
30	2.52	9.79
45	1.41	7.19
60	1.33	7.19
65	0.83	7.30
70	0.99	6.34
75	2.10	6.48
90	0.86	6.75

Para la siguiente serie de experimentos se propuso variar la concentración de proteína contenida en las VMPs, para obtener la concentración óptima obteniéndose los resultados que se muestran en la Fig.9.

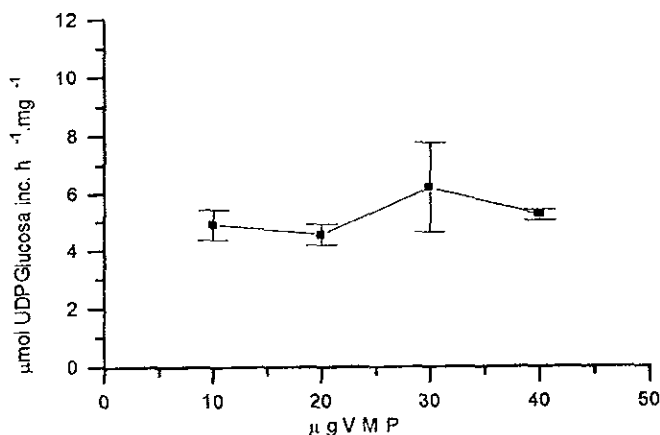


Fig 9. Determinación de la actividad de la GSII a diferentes concentraciones de proteína de vesículas de membrana plasmática. Las concentraciones de proteína se incubaron en el medio de reacción por 60 minutos y se midió la incorporación de UDPG-glucosa a glucana por 1 hora

Se encontró que en el intervalo de 10 a 40 μg de proteína, la actividad de la glucan sintetasa II era prácticamente la misma, si bien la incorporación

de radioactividad es baja a concentraciones bajas de proteína (aprox. 10 μg), por lo que se eligió la concentración de 40 μg para los estudios posteriores con la toxina Fumonisina B1. Con esta cantidad de proteína, se obtiene un número adecuado de cpm por arriba del blanco y además no era gravosa para la cantidad de proteína que se obtiene por preparación membranal.

3. EFECTO *IN VITRO* DE LA FB1 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GS II

La siguiente serie de experimentos se diseñó con el objetivo de observar el efecto de la incubación de las VMP con FB1 20 μM sobre la actividad de la GS II, los tiempos que se probaron fueron de 0, 15 y 30 min. Los resultados se muestran en la Fig. 10, donde se observa que la actividad de la GS II no cambió significativamente en el transcurso del tiempo de 30 min de incubación con la FB1. En esta serie de experimentos se adicionó el sustrato (UDPGlucosa), después del periodo de incubación con la toxina para comenzar la reacción de actividad de la GS II.

Para la siguiente serie de ensayos se comenzó la reacción adicionando simultáneamente tanto la FB1 (a concentraciones de 5, 10 y 20 μM) como el sustrato, a las VMPs por espacio de una hora. Los resultados obtenidos de este experimento se muestran en la Fig. 11.

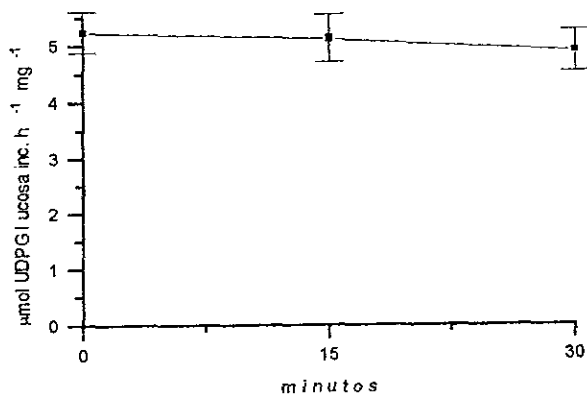


Fig. 10. Efecto del tiempo de incubación de la FB1 sobre la actividad de la GS II *in vitro*. Cuarenta µg de proteína de vesículas de membrana plasmática se expusieron a 20 µM de FB1 por los tiempos indicados arriba. Al terminar estos tiempos, se añadió el sustrato y se dejó reaccionar durante 1 hora para permitir la incorporación de UDPG por la GS II según se describe en Materiales y Métodos.

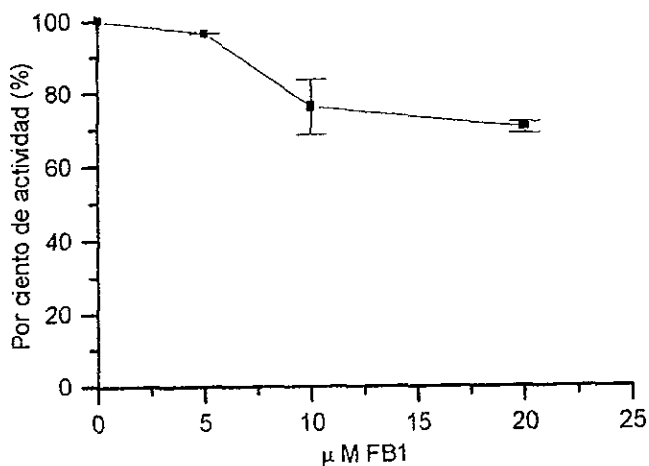


Fig. 11. Efecto de la FB1 en la actividad de la GS II *in vitro*. Cuarenta µg de proteína de membrana plasmática se añadieron al medio de reacción que contenía FB1 a las concentraciones finales indicadas. La reacción transcurrió por 1 hora para medir la incorporación de UDPG-glucosa a glucana, según se describe en Materiales y Métodos

En la Fig. 11 se observó que conforme aumenta la concentración de FB1 disminuye la actividad de la enzima. A la concentración de 10 μM se apreció un efecto significativo del 30% de inhibición sobre la actividad de la enzima. Este mismo % de inhibición se mantiene hasta concentración de 20 μM . Hay que hacer notar que en este experimento la enzima tuvo acceso simultáneo a la toxina y al sustrato, a diferencia del experimento anterior de la Fig. 10, en donde la enzima tuvo acceso a la toxina primero y luego al sustrato.

4. EFECTO *IN VIVO* DE LA FB1 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GS II

Para esta parte experimental, se adicionó la toxina FB1, a una concentración de 20 μM , a la solución de imbibición y enseguida se adicionaron los embriones manteniendoles en esta solución durante 24 horas a 37°C. Después se siguió el procedimiento ya descrito para extraer las VMPs, determinar su concentración de proteína y ensayar el efecto de la FB1, sobre la actividad de la GS II. Paralelamente, también se pusieron a embeber embriones, pero sin la toxina FB1 (control), se extrajeron las VMPs de la forma ya descrita en la metodología, se determinó la concentración de proteína y se ensayó la actividad de la GS II en las mismas condiciones que las VMPs que contenían la toxina FB1. Para todos los experimentos se emplearon 40 μg de proteína contenidas en las VMPs y a cada tubo se le

adicionaron 4 μ L de UDPGlucosa- 3 H. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 12.

En esta figura se observa que el porcentaje de actividad de la GSII de VMP obtenidas de embriones que estuvieron en contacto con la toxina fue de aproximadamente 230%. Esto es, que se incrementó su actividad 1.3 veces con respecto al control, sin FB1 (100% de actividad). Esta figura representa el promedio de ocho experimentos realizados de forma independiente.

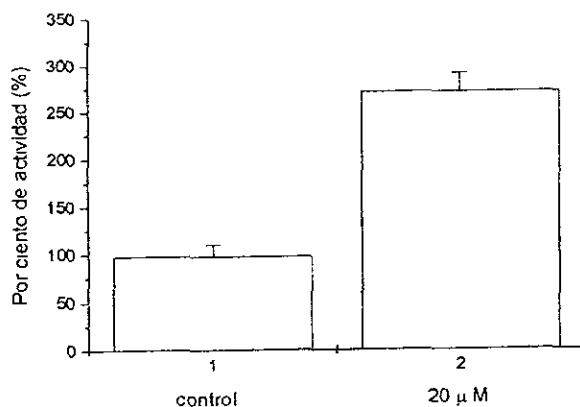


Fig 12. Efecto de la FB1 en la actividad de la GS II *in vivo*. Treinta gramos de embriones se embebieron con FB1 20 μ M, por 24 horas, como se describió en Materiales y Métodos. Las vesículas de membrana plasmática se obtuvieron y en ellos se midió la actividad de la GS II como se describió en Materiales y Métodos.

DISCUSION

Como se ha revisado anteriormente, la enzima 1,3- β -glucan sintetasa (GS II) se encarga de enlazar monómeros de glucosa para formar callosa, la cual sirve para reforzar la pared celular como parte de la defensa del hospedero contra el ataque de microorganismos patógenos como los hongos.

Lo que primero se planteó en este trabajo, fue encontrar las condiciones óptimas de operación *in vitro* para maniobrar experimentalmente con la enzima y después realizar los ensayos de actividad de la proteína en presencia de FB1.

Un dato interesante en el inicio del trabajo es que la recuperación de membranas microsomales fue siempre menor cuando los embriones se embebieron con FB1. Este resultado sugiere que la FB1 puede estar disminuyendo la síntesis o el ensamble de componentes membranales. Una manera de probar este efecto es hacer un ensayo de síntesis de proteínas *in vitro*. Hasta ahora, no hay ningún reporte en la literatura que indique que la FB1 puede tener este efecto.

Los experimentos con la fracción microsomal mostraron valores de velocidad y de actividad específica menores, comparados con los obtenidos con la fracción de membranas plasmáticas purificadas. Esto era de esperarse, puesto que los ensayos realizados con la fracción microsomal contenían una menor proporción de GS II en términos de mg de proteína, ya que esta fracción contiene otras fracciones membranales, en cambio las VMP tienen

vesículas que contienen predominantemente GS II y no otros tipos de membrana con otras proteínas.

Los experimentos de velocidad de incorporación de la UDPGlucosa en el transcurso del tiempo indicaron que la enzima se encuentra activa y con actividad catalítica *in vitro* semejante a la de otras preparaciones de GS II como las de hojas y raíces de chicharos (Kauss y col. 1983, Bowles y col. 1972).

Se observó que la actividad específica de la enzima en el intervalo de 10 a 40 μg de proteína membranar por ensayo, era la misma. Esto indica que el sustrato se encuentra en exceso con respecto a la concentración de la enzima y que en el tiempo de reacción ensayado (60 min), además de que el sustrato fue suficiente, el producto formado no alcanza concentraciones que pudieran inhibir a la enzima, en el caso de que ésta fuera inhibible por un exceso de su producto.

En los experimentos *in vitro* en los cuales se añadió la toxina a la enzima antes del sustrato, la FB1 no afectó a la GS II, aún a una concentración de 20 μM de toxina y 30 minutos de exposición. Algunos efectores de la actividad enzimática necesitan un tiempo para interactuar con sitios específicos en la enzima, pero este no es el caso de la FB1 con la GS II por el resultado mencionado. El hecho de que la FB1 no afecte la actividad de la GS II cuando se añade antes que el sustrato, sugiere que la GS II inactiva tiene una conformación tal que sólo expone sitios a la FB1, que son

irrelevantes sobre la actividad de la enzima. Es posible que los sitios de unión de la FB1 con la enzima sean los sitios de contacto enzima membrana, dadas las características estructurales de la FB1 (Thibault y col).

Es posible que no toda la GS II tenga los sitios accesibles al sustrato debido a que las vesículas pueden tener la polaridad original a la de la célula, ya que se ha reportado que la enzima tiene el sitio catalítico hacia la cara citosólica de la membrana (Fincher y Stone 1981, Eschrich 1975). Sin embargo, podemos inferir que toda la actividad detectable de GS II es la de la enzima expuesta y que cualquier efecto de la FB1 que se aprecie sobre la actividad de la enzima, esta dado por la accesibilidad de la GS II a la toxina. Una manera de confirmar esto eran los experimentos con BRIJ, sin embargo, este detergente no resultó adecuado para este propósito.

Por el contrario, en los experimentos *in vitro* en donde la toxina se añadió a la GS II simultáneamente al sustrato, sí se observo una disminución significativa de la actividad (de 30%).

Estas dos formas de acción de la toxina sobre la GS II *in vitro* sugieren que en el caso de exponer la enzima a la toxina antes de agregar el sustrato, la FB1 no interactuó con la enzima para producirle algún efecto, debido a la conformación de la forma inactiva y nos llevaría a proponer que la enzima tiene un sitio de unión para la toxina que inhibe a la enzima, mismo que se encuentra oculto en ausencia de sustrato y que sólo se expone cuando la enzima se encuentra activa. Esta situación es alcanzada por la GS II

cuando la toxina se añade simultáneamente al sustrato. Una implicación directa de esta interpretación es que la concentración de FB1 libre es rápidamente abatida tras su adición a las vesículas membranales, pues ya no está accesible a los sitios de la enzima cuando el sustrato es añadido posteriormente.

Estos datos son consistentes con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en los que se observa una perturbación inmediata de la fluidez membranal cuando se añade FB1 (Gutiérrez-Nájera y col. 2000). La interpretación también es favorecida por otros datos en la literatura que indican que la FB1 puede intercalarse en la membrana debido a su naturaleza anfipática, con su "core" alifático pero con varios grupos R muy polares, en especial los carboxilos (Yin y col. 1996).

En este caso se propone la interacción sustrato-enzima-toxina. Una manera de determinar estas interacciones sería a través de un estudio de la inhibición por FB1 en la cinética de la GS II.

Con respecto a los resultados de los ensayos *in vivo*, se encontró que la actividad de la GS II se podía incrementar 130 % con respecto al control, sugiriendo un efecto importante de la FB1 sobre la enzima. En este experimento se pusieron a embeber los embriones con FB1 20 μM y después se extrajeron las membranas, lo mismo se hizo con un control en el que no se añadió FB1 a estos embriones al momento de ser puestos a embeber. Este resultado sugiere que la FB1 es capaz de alcanzar las membranas plasmáticas

de los tejidos embrionarios y ejercer un efecto estimulador permanente sobre la actividad de la GS II, ya que el efecto es medido después de que las vesículas han sido extraídas de los embriones expuestos a la FB1. Es difícil explicar como la FB1 puede ejercer este efecto y se tiene que considerar que la FB1 no ejerce una acción directa sobre la GS II, sino que su acción puede ser atribuida a factores indirectos que pudieran estar mediando esta estimulación. En este sentido, algunos candidatos podrían ser la defosforilación o fosforilación de la GS II por fosfatasa o cinasas específicas que podrían ser atribuidos a su vez por la FB1 o por otra molécula intermediaria como las bases esfingoides, mismas que se acumulan por la acción de la FB1 sobre la ceramida sintasa (Wang y col. 1991, Merrill y col. 1993). Se ha descrito que la GS II puede estar regulada por factores endógenos tales como la actividad de proteasas, en la cual se sugiere que la GS II puede estar en forma de zimógeno y que en estados de estrés de la planta, se activan las proteasas de forma moderada para generar la GS II activa y después que ha reparado el daño, las proteasas actúan más energicamente por lo que atacan a la GS II y con esto disminuir su respuesta y actividad (Kauss y col. 1983).

El efecto *in vivo* encontrado en este trabajo sugiere que la actividad se incrementa para elevar la capacidad de respuesta de defensa de la célula contra la infección por el patógeno, aumentando la resistencia de la pared

celular (Van Der Woude. 1974, Currier 1957, Shafizader y col. 1973, Bowles y col. 1972, Eisinger y Ray 1972, Hardin y col. 1972, Wooding. 1968).

Los objetivos particulares de este trabajo se lograron ya que :

- ◆ Es posible aislar vesículas de membranas plasmáticas de embriones de maíz utilizando la técnica de reparto de fases acuosas, polietilenglicol/dextrán.
- ◆ Se montó la metodología y las condiciones experimentales necesarias para determinar la actividad de la 1,3-β-glucan sintetasa, empleando UDPGlucosa³H.
- ◆ Se comprobó la actividad de la GS II *in vitro*, utilizando VMP de embriones de maíz.
- ◆ La fitotoxina FB1 incrementa la actividad sobre la GS II *in vivo* alrededor de 1.3 veces más con respecto al control.

CONCLUSIONES

Tomando como base los objetivos generales propuestos al comienzo de esta tesis, se desprenden las siguientes conclusiones finales:

- Con respecto al ensayo *in vitro*, la fitotoxina FB1 es capaz de producir un efecto sobre la actividad de la GS II, disminuyendo la actividad hasta un 30% cuando la toxina se adiciona a una concentración 20 μM, este efecto

ocurre sólo si se adicionan la toxina y el sustrato al mismo tiempo con las VMP. En contraste, no existe ningún efecto si primero se incuban las VMP con la toxina y después se adiciona el UDP-glucosa³H. Estos experimentos sugieren un posible mecanismo de acción de la FB1 a sitios específicos de la enzima.

- Los resultados de la experimentación *in vivo* nos muestran que la FB1 incrementa la actividad de la GS II contenida en las VMP de embriones de maíz con respecto a un control.

APÉNDICE

Solución utilizada para la germinación de los embriones.

- Solución de imbibición: KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.6, sacarosa 2 % y cloramfenicol 10 µg/ml. Esta solución se prepara según el volumen que se vaya a utilizar, se esteriliza y se guarda en refrigeración para su uso.
- Agua destilada esterilizada. El agua destilada se ocupa como diluyente de la solución de imbibición, ya que se utiliza una relación 1:3, es decir, un volumen de solución de imbibición con dos volúmenes de agua.

Soluciones utilizadas para extraer las vesículas de membrana plasmática.

- Solución amortiguadora de homogeneización: HEPES/BTP 50 mM pH 7.8, Sorbitol 250 mM, EDTA 1 mM, KCl 1 mM, DTE 5 mM y Cocktail de inhibidores de proteasas 40µg/ml (marca Boehringer).
- Solución amortiguadora de resuspensión del “pellet” microsomal y de ajuste de peso: Sorbitol 500 mM, KH₂PO₄ 5 mM, pH 7.8, KCl 0.2 mM y DTE 5 mM.
- Solución amortiguadora de Mezcla de fases: Dextran T500 6.7%, Polietilenglicol 3350 (PEG) 6.7%, Sorbitol 500 mM, KCl 0.2 mM y KH₂PO₄ 5 mM pH 7.8

Soluciones requeridas para realizar la determinación de proteína por el método de Lowry modificado por Peterson (Peterson, G.L 1977, Anal. Biochem. 83 (346-356).

- Desoxicolato de sodio 0.15%
- Solución CTC: Na_2CO_3 10%, CuSO_4 0.1% y $\text{K}_2\text{C}_4\text{O}_6$ (Tartrato doble de potasio) 0.2%.
- Solución I: Mezclar volúmenes iguales de agua y de las soluciones de NaOH 0.8 M, SDS 10%, y CTC.
- Reactivo de Folin: Diluir en 5 volúmenes de agua 1 volumen de estándar comercial de Folin (Sigma Chemical Company).

Se tomaron 0.9 mL de agua destilada en la que se diluyen 3 μL de la muestra a cuantificar (esto se hace por triplicado). Posteriormente se añaden 0.1 mL de la solución desoxicolato, 1.0 mL de la solución I, y 0,5 mL del reactivo de Folin. Agitar y esperar 30 minutos a que se desarrolle el color. Leer absorbancia a 750 nm.

A partir de un estándar de BSA (albúmina de suero de bovino) de 1 mg/mL, se agregaron 10, 20, 40, 50, 60 y 80 μL de la solución estándar más agua cbp 0.9 mL. Se desarrolló color de la manera ya indicada. El intervalo de cuantificación es de 10 a 80 μg de proteína en el volumen de ensayo.

- Solución de centelleo : se pesaron 5 g de 2,5-Difeniloxazol (PPO), y se disolvieron en 1 litro de tolueno.

BIBLIOGRAFIA

1. Ayres J, Mondt J y Sandine W. 1980. *Microbiology of foods* W.H Freeman San Francisco USA. pp707.
2. Benhamou W. 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 1: 233-239.
3. Bezuidenhout S, Gelderblom W, Gorst-Allman C, Marasas W, Spiteller G y Vleggaar R. 1998. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme* J. Chem. Soc. Commun : 743-745.
4. Bewley D y Black M. 1985. *Seeds: Physiology of development and germination*. Plenum Press, New York USA. pp 367.
5. Bowles DJ y Northcote DH. 1972. The sites of synthesis and transport of extracellular polysaccharides in the root tissues of maize. *Biochem. J.* 130: 1133-1145.
6. Currier HB. 1957. Callose substances in plant cells. *Amer. J. Bot.* 44: 478-488.
7. Chatterjee D y Mukherjee S. 1994. Contamination of Indian maize with fumonisin B1 and its effects on chicken macrophages. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 251-253.
8. Delmer DP, Volokita M, Solomon M, Fritz U, Delphendohl W y Hert W. 1993. A monoclonal antibody recognizes a 65 kD higher plant membrane polypeptide which undergoes cation-dependent association with callose

- synthase *in vitro* and co-localizes with sites of high callose deposition *in vivo*. *Protoplasma*. 176: 33-42.
9. Desjardins AE y Hohn R. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 147-152.
 10. Devlin T. 1997. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. Wiley-Liss, New York USA pp 1186.
 11. Dhugga KS y Ray PM. 1991. A 55 Kilodalton plasma membrane associated polypeptide is involved in β -1,3-glucan synthase activity in pea tissues. *FEBS Lett.* 278: 283-286.
 12. Dhugga KS y Ray PM. 1991. Isoelectric focusing of plant plasma membrane proteins. Further evidence that a 55 kilodalton polypeptide is associated with β -1,3-glucan synthase activity from pea. *Plant Physiol.* 95: 1302-1305.
 13. Dhugga KS, Ulvskov P, Gallagher SR, Ray PM. 1991. Plant polypeptides reversibly glycosylated by UDP-glucose. Possible components of Golgi β -glucan synthase in pea cell. *J. Biol. Chem.* 266: 21977-21984.
 14. Dupuy J, Bars P y Boudra H. 1993. Thermostability of fumonisin B1, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2864-2867.
 15. Eisinger W y Ray PM. 1972. Function of Golgi apparatus in synthesis and transport of cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 49: S-2.

16. Eschrich W. 1975. Sealing systems in phloem. En: Zimmermann MH, Milburn JA Transport in plants. I Phloem transport Springer-Verlag, Berlin pp 39-56.
17. Fincher GB y Stone BA. 1981. Metabolism of noncellulosic polysaccharides. En : Tanner W, Loewus, F.A, ed, Encyclopedia of Plant Physiology, Plant carbohydrates II. Extracellular carbohydrates Springer-Verlag, Berlin pp 68-132.
18. Fink J, Jeblick W y Kauss H. 1990. Partial purification and immunological characterization de 1,3- β -glucan synthase from suspension cell of *glycine max*. *Planta* 181: 343-348.
19. Gelderblom W, Jaskiewicz K, Marasas W, Thiel PG, Horak RM, Vlegaar R y Kriek N. 1988. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1806-1811.
20. Gelderblom WC, Kriek NP, Marasas W y Thiel PG. 1991. Toxicity and Carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis* 12: 1247-1251.
21. Gelderblom WC, Semple E y Marasas WF. 1992. The cancer-initiating potencial of the fumonisin B1 mycotoxins. *Carcinogenesis* 13: 433-437.
22. Girard V y Maclachlan G. 1987. Modulation of pea membrane β - glucan synthase activity by calcium, polycation, endogenous protease and protease inhibitor. *Plant Physiol.* 85: 131-136.

23. Gutiérrez-Nájera N, Plasencia J y Gavilanes-Ruiz M. Study of the fumonisin B1 effect on the fluidity and sphingolipid composition of plasma membrane from germinating maize embryos. Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists. San Diego USA Jul 15-Jul 19 2000.
24. Hardin JW, Cherry JH, Morré DJ y Lembi CA. 1972. Enhancement of RNA polymerase activity by a factor released by auxin from plasma membrane Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A 69: 3146-3150.
25. Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE y Cole JR. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Diagn. Invest. 2: 217-221.
26. Isaac S. 1992. Fungal-Plant Interactions. Chapman and Hall, London Inglaterra pp 110-135.
27. Jackson A y Taylor C. 1996. Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. Plant Cell. 8 : 1651-1668.
28. Kamat U, Gary R y Sharma CB. 1992. Purification to homogeneity and characterization of a 1,3- β -glucan synthase from germinating *Arachis hypogaea* cotyledons. Arch. Biochem. Biophys. 298: 731-739.
29. Kauss H y Thompson KS. 1982. Plasmalemma and tonoplast: Their function in the plant cell. Elsevier, New York pp 262.

30. Kauss H, Kohle H y Jebleck W. 1983. Proteolytic activation and stimulation by Ca^{2+} of glucan synthase from soybean cells. *FEBS* 158: 84-88.
31. Knogge W. 1998. Fungal pathogenicity. *Curr. Op. Plant Biol.* 1: 324-328.
32. Krick NP, Marasas WF y Thiel PG. 1981. Hepato and cardiotoxicity of *Fusarium moniliforme* isolated from Southern African maize food. *Cosmet. Toxicol.* 19: 447-456.
33. Kuribayashi I, Murita T, Mitsui T y Igave I. 1993. Purification of β -glucan synthase II from suspension cultured rice cells. *Bios. Biotech. Biochem.* 57: 682-684.
34. Larsson C y Moller IM. 1988. The plant plasma membrane: Structure, function and molecular biology. Springer-Verlag Berlin Alemania pp 418.
35. Lindner E. 1995. Toxicología de los alimentos Acribia, Madrid pp 398.
36. Meikle PJ, Bonig I, Hoogenraad NJ, Clarke AE y Stone BA. 1991. The location of (1-3)- β -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1-3)- β -glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* 185: 1-8.
37. Meikle PJ, Johnson E, Hoogenraad NJ y Stone BA. 1991. The β -glucan synthase from *Lolium multiflorum*. Detergent solubilization, purification using monoclonal antibodies and photoaffinity labeling with a novel photoreactive pyrimidine analogue of uridine 5'-diphosphoglucose. *J. Biol. Chem.* 266: 22569-22581.

38. Merrill AH, Echten GV, Wang E y Sandhoff K. 1993. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphingamine) N-acyltransferase and the *nov* sphingolipid biosynthesis in culture neurons *in situ*. J. Biol. Chem. 268: 27299-27306.
39. Moore-Landecker E. 1990. Fundamentals of the fungi. Prentice-Hall, Englewood Cliffs New Jersey pp 561.
40. Moreno B. 1983. Microorganismos de los alimentos: Técnicas de análisis microbiológico. Acribia, Madrid pp 431.
41. Morré DJ, Brightman AO y SnadeliuS AS. 1990. Membrane fractions from plant cells. En: *Biological membranes. A practical approach*. Find JBC y Evans WH Eds. IRL Press, Oxford University U.K pp 50-79.
42. Rheeder JP, Marasas WF, Thiel PG, Sydenham EW, Shepard GS y Schalwyk GS. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 82: 353-357.
43. Rumbelha W y Oehme F. 1997. Fumonisin exposure to Kansas through consumption of corn-based market foods. *Vet. Human. Toxicol.* 39: 220-225
44. Sánchez -Nieto S, Gómez-Puyou MT, Rodríguez-Sotro R, Carvallo A y Gavilanez-Ruiz M. 1998. Comparison of plasma membrane H⁺-ATPasa

- activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos.
Biochem. Biophys. Acta. 77475: 1-13.
45. Scott PM. 1993. Fumonisin. J. Food Microbiol. 18: 257-270.
46. Shafizadeh F, McGinnis GD. 1971. Morphology and biogenesis of cellulose and plant cell-walls. Adv. Carbohydrate Chem. 26: 297-349.
47. Sloan ME, Rodis P y Wasserman BP. 1987. CHAPS solubilization and functional reconstitution of β -glucan synthase from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. Plant Physiol. 85: 516-522.
48. Stone BA y Clarke AE. 1992. Chemistry and Biology of (1-3)- β -glucans. La trobe University Press, Bundora, Australia pp 123-145.
49. Sydenham EW, Shepard GS, Thiel PG, Marasas WF y Stockenstrom S. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. J. Agric. Food. Chem. 39: 2014-2018.
50. Thibault N, Burgat V y Guerre P. 1997. Les fumonisines: nature, origine et toxicité. Rev. Med. Vét. 148: 369-388.
51. Van Der Woude WJ, Lembi CA y Morré DJ. 1972. Auxin (2,4-D) stimulation (*in vivo* and *in vitro*) of polysaccharide synthesis in plasma membrane fragments isolated from onion stems Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 245-253.
52. Voss KA. 1990. Toxins from *fusarium moniliforme*, a common fungus in corn. Vet. Human. Toxicol 32: 57-63.

53. Voss KA, Norred WP y Bacon CW. 1992. Subchronic toxicological investigations of *Fusarium moniliforme*-containing corn, culture material, and ammoniated cultured material. *Mycopathology*. 117: 97-104.
54. Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT y Merrill AH. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* 266: 14486-14490
55. Wooding FB. 1968. Radioautographic and chemical studies of incorporation into sycamore vascular tissue walls *J. Cell Sci.* 3: 71-80