



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD DE LA NADPH
OXIDASA, COMPUESTOS ESFINGOIDEOS Y
RESPUESTA A PATÓGENOS EN CÉLULAS
VEGETALES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA

PRESENTA:

PRISCILA RODRÍGUEZ MEJÍA

MÉXICO, D.F. ABRIL DE 2006





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. Irma Ofelia Bernal Lugo
Vocal	Dra. Marina Gavilanes Ruíz
Secretario	Dr. Eleazar Martínez Barajas
1er suplente	M. en C. Luis Tonatihut Sánchez Linares
2º suplente	M. en C. Vanessa Rebeca Maya Ampudia

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

Asesora Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Supervisora técnica Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo

Sustentante Priscila Rodríguez Mejía

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Riveros Rosas de la Facultad de Medicina de la UNAM por su excelente enseñanza en estrategias y manejo de herramientas informáticas de análisis de las estructuras primarias de NADPH oxidasas contempladas en el diseño del péptido antigénico utilizado en este trabajo.

Al Dr. Diego González Halphen del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por la asesoría brindada para la búsqueda y diseño del péptido antigénico.

A la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por su ayuda en la obtención del suero inmune contra el péptido antigénico.

A los doctores: Irma Ofelia Bernal Lugo, Marina Gavilanes Ruíz y Eleazar Martínez Barajas por la revisión y correcciones realizadas al presente trabajo.

FINANCIAMIENTO

Priscila Rodríguez Mejía realizó esta tesis con el apoyo del Subprograma 127 "Formación Básica en Investigación", de la Coordinación de Superación Académica de la Facultad de Química de la UNAM.

Este trabajo fue financiado por los proyectos CONACYT (40311-Q), y UC-MEXUS, Universidad de California y CONACYT (CN-03-118).

DEDICATORIA

En la conclusión de este trabajo han intervenido muchas personas, vaya para todos ellos mi más profundo agradecimiento:

*Mamá, papá, Cheli, Paulina, Pablo,
Tía Celia, Gaby,
María, Jocelyn, Antonieta, Ulises, Alejandro, Raúl, Fernando,
Gerardo, Marlenne,
Mini-Chiquitanum, Kaliman,
Dra. Marina, Chelo, Laura, Christian, Silvia, Mariana, Liliana, Dr. Javier, Sra. Jose,
Beto*

	Página
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1.1 Mecanismos de resistencia ante el ataque de patógenos en plantas .	3
2.1.2 Transmisión de señales de alarma al hospedero	6
2.1.3 Defensas estructurales inducidas	6
2.1.4 Respuesta de hipersensibilidad	6
2.1.5 Reforzamiento de la pared celular del hospedero con moléculas reforzadoras	8
2.1.6 Resistencias local y sistémica	8
2.2 Especies reactivas de oxígeno	9
2.3 Características de la NADPH oxidasa de mamíferos	12
2.3.1 Conformación de NOX2, la subunidad catalítica de la NADPH oxidasa en mamíferos	13
2.3.2 Regulación de la NADPH oxidasa	14
2.4 Especies reactivas de oxígeno en plantas	15
2.4.1 Generación de ERO en plantas	15
2.4.2 Estrés abiótico	15
2.4.3 Explosión oxidativa en plantas	16
2.4.4 La NADPH oxidasa codificada por Rboh de células vegetales .	17
2.4.5 La NADPH oxidasa en interacciones bióticas	17
2.4.6 La Rboh-NADPH oxidasa en estrés abiótico y desarrollo	18
2.4.7 Defensas contra el estrés oxidativo	19
2.4.8 Desintoxicación enzimática	19
2.4.9 Entrecruzamiento de proteínas de la pared celular	19
2.4.10 Desencadenamiento de la muerte celular programada	20
2.4.11 Relación con la resistencia sistémica adquirida	20
2.4.12 Señalización por MAP cinasas	20
2.5 Esfingolípidos membranales	21
2.6 Fumonisinias	23
3. ANTECEDENTES INMEDIATOS	25

4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos específicos	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
Material biológico	27
Métodos	27
6.1 Imbibición de embriones	27
6.1.1 Control	27
6.1.2 En presencia de compuestos esfingoideos	27
6.2 Obtención de las fracciones membranales de embriones de maíz.	29
6.2.1 Obtención de la fracción microsomal	29
6.2.2 Obtención de vesículas de membrana plasmática	29
6.3 Determinación de proteína	30
6.4 Medición de actividad de NADPH oxidasa en disolución	31
6.4.1 Reducción de NBT y XTT.	31
6.4.2 Uso de inhibidores	31
6.4.3 Efecto de FB ₁ y SN añadidos <i>in vitro</i> a vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz en la reducción de NBT	32
6.5 Separación electroforética de proteínas	32
6.5.1 Preparación de los geles	32
6.5.2 Tinción con azul de Coomasie	33
6.6 Renaturalización de la NADPH oxidasa en gel y determinación de actividad.	33
6.6.1 Tratamiento previo a la separación electroforética	33
6.6.2 Lavado del gel para sustituir el SDS por Tritón X-100	34
6.6.3 Renaturalización de la NADPH oxidasa	34
6.6.4 Determinación de actividad de NADPH oxidasa por reducción de NBT en gel	34
6.6.5 Uso de inhibidores en el ensayo de actividad de NADPH oxidasa en gel	34
6.7 Electrotransferencia de proteínas de geles de poliacrilamida SDS a una membrana de PVDF	34
6.8 Inmunodetección de la NADPH oxidasa (técnica de réplica en Western)	35
6.9 Obtención del anticuerpo contra un fragmento de la porción carboxilo terminal de la NADPH oxidasa de células vegetales	36

6.9.1	Búsqueda de una secuencia de aminoácidos conservada y antigénica dentro de las NADPH oxidasas de células vegetales	36
6.9.2	Obtención del anticuerpo	36
7.	RESULTADOS	38
7.1	Ensayo de actividad de NADPH oxidasa en disolución	38
7.1.1	Determinación del tiempo de reacción y concentración de proteína en la reducción de NBT y/o XTT	38
7.1.2	Efecto de la concentración de NADPH en la reducción de NBT	39
7.1.3	Efecto de la concentración de Ca ²⁺ en la reducción de NBT	39
7.1.4	Efecto del DPI y SOD en la reducción de NBT y XTT	40
7.1.5	Efecto de Rotenona y NaN ₃ en la reducción de NBT	41
7.1.6	Reducción de NBT y XTT por vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos en presencia de FB ₁ , SN o PS durante 24 h	42
7.1.7	Reducción de NBT y XTT por vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos en presencia de diferentes concentraciones de FB ₁ o SN	44
7.1.8	Reducción de NBT por vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos en medio control durante 24 h y expuestas a FB ₁ o SN <i>in vitro</i>	45
7.1.9	Reducción de NBT y XTT por fracciones microsomales de embriones de maíz sin germinar embebidos durante 3, 6 ó 12 h en presencia de FB ₁	46
7.1.10	Reducción de NBT y XTT por fracciones microsomales de embriones de maíz embebidos durante 22 h en medio control y transferidos a un medio con FB ₁ , SN o PS durante 3, 6 ó 12 h adicionales	47
7.2	Ensayo de actividad de NADPH oxidasa en gel	49
7.2.1	Detección de proteínas que catalizan la reducción de NBT dependiente de NADPH en fracciones de membrana plasmática de embriones de maíz y hojas de tabaco	49
7.2.2	Efecto de DPI y SOD en la reducción de NBT dependiente de NADPH catalizada por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz	50
7.2.3	Reducción de NBT en gel por fracciones de membrana plasmática de embriones de maíz expuestos a FB ₁ , SN o PS durante 24 h	51

7.3	Búsqueda de una secuencia de aminoácidos conservada y antigénica para la NADPH oxidasa de células vegetales	
7.4	Pruebas de optimización del procedimiento de inmunoréplica.	52
7.4.1	Pruebas de especificidad del anticuerpo	54
7.4.2	Condiciones de eliminación de reactividad inespecífica del anticuerpo	54
7.4.3	Detección de la NADPH oxidasa en microsomas de células vegetales	55
8.	DISCUSIÓN	55
8.1	Técnicas de medición de ERO	57
8.2	Inhibidores de la reducción de los colorantes de tetrazolio	58
8.3	Efecto de los compuestos esfingoideos en la formación del radical superóxido medida en disolución	60
8.4	Efecto de los diferentes tipos de exposición a los compuestos esfingoideos en la formación del radical superóxido medida en disolución	62
8.5	Efecto de los compuestos esfingoideos en la formación del radical superóxido. Ensayo en gel	65
8.6	Inmunodetección de bandas reactivas a un anticuerpo diseñado contra una secuencia de aminoácidos conservada de la NADPH oxidasa de células vegetales	67
9.	CONCLUSIONES PARTICULARES.	69
10.	CONCLUSIÓN GENERAL.	72
11.	PERSPECTIVAS	72
12.	BIBLIOGRAFÍA	73
		74

	Página
1. Vista simplificada de la problemática planta-patógeno.	4
2. Respuesta de hipersensibilidad presentada por una planta.	7
3. Esquema simplificado de la generación y reactividad de varias ERO.	11
4. Activación de la NADPH oxidasa de neutrófilos.	13
5. Estructura de gp91 ^{phox} /NOX2.	14
6. Estructura de algunas de las bases esfingoideas más abundante en los tejidos animales y vegetales.	21
7. Estructura de la FB ₁	24
8. Estrategia experimental seguida para determinar la actividad de la NADPH oxidasa en embriones de maíz.	28
9. Condiciones de determinación del radical superóxido en membranas plasmáticas de embriones de maíz.	38
10. Cinética de reducción de NBT dependiente de la concentración de NADPH	39
11. Reducción de NBT por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz en presencia de diferentes concentraciones de Ca ²⁺ y EDTA o EGTA	40
12. Efecto de los inhibidores DPI y SOD en la reducción de NBT y XTT por proteínas membranales de embriones de maíz.	41
13. Efecto de los compuestos Rotenona, NaN ₃ y DPI en la reducción de NBT por proteínas de fracción microsomal de embriones de maíz	42
14. Reducción de colorantes de tetrazolio en presencia o ausencia de DPI por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos 24 h en presencia de FB ₁ , SN o PS.	43
15. Reducción de NBT y XTT en presencia o ausencia de DPI por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos 24 h en presencia de FB ₁ o SN a concentraciones de 10 ó 20 μM	44
16. Reducción de NBT por proteínas de membrana plasmática de embriones embebidos 24 h en medio control y expuestos a FB ₁ y SN <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	46
17. Reducción de los colorantes de tetrazolio NBT y XTT por proteínas de fracción microsomal de embriones de maíz sometidos a imbibición continua durante 3, 6 ó 12 h en presencia o ausencia de FB ₁	47

18. Reducción de NBT y XTT debida a proteínas de embriones embebidos 22 h en medio control y transferidos a medios que contenían FB ₁ , SN o PS durante 3, 6, ó 12 h más respectivamente.	48
19. Determinación de actividad de NADPH oxidasa en gel usando proteínas de fracción microsomal y de membrana plasmática de hojas de tabaco y embriones de maíz embebidos 24 h en medio control.	50
20. Determinación de actividad de NADPH oxidasa en gel en presencia de DPI y SOD usando proteínas de membrana plasmática de hojas de tabaco y embriones de maíz embebidos 24 h en medio control.	51
21. Determinación de actividad de NADPH oxidasa en gel usando proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos 24 h en presencia de FB ₁ , SN o PS a una concentración de 20 µM.	52
22. Árbol filogenético para 56 secuencias de aminoácidos correspondientes a NADPH oxidasas de diferentes especies vegetales más dos correspondientes a la subunidad gp91 ^{phox} de mamíferos y una correspondiente a una reductasa férrica de <i>Arabidopsis</i> (A). Sección del alineamiento correspondiente a una porción de la región del extremo carboxilo terminal, en la que se señalan las principales regiones antigénicas según los algoritmos de Hoop/Woods, Parker y Welling (B). Secuencia de aminoácidos elegida para la síntesis del polipéptido antigénico contra la NADPH oxidasa (C). Estructura propuesta para la subunidad de la NADPH oxidasa de plantas (D)	53
23. Reactividad de fracciones microsomales de maíz y tabaco contra el suero obtenido del conejo inmunizado con el péptido integrado y acoplado a hemocianina de lamprea. Evaluación de la reactividad del suero en ensayos de réplica en Western con diferentes condiciones de dilución del suero.	54
24. Reactividad de fracciones microsomales de maíz y tabaco contra el suero obtenido del conejo inmunizado con el péptido integrado y acoplado a hemocianina de lamprea. Ensayos de réplica en Western utilizando diferentes concentraciones de leche para eliminar los sitios inespecíficos al anticuerpo en la membrana de PVDF.	55
25. Detección de reducción de NBT por proteínas de fracciones microsomales de hojas de tabaco y embriones de maíz	56

26. Representación esquemática de la cinética de la explosión oxidativa en cultivos de células en suspensión o plantas posterior al tratamiento con varios tipos de moléculas elicitoras	66
27. Modelo propuesto para la activación de la NADPH oxidasa de embriones de maíz expuestos <i>in vivo</i> a FB ₁ y SN	71

	Página
1. Composición de las mezclas y sistemas de fases para la obtención de vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz.	30
2. Composición de un gel de acrilamida según el método de Schägger y von Jagow.	32
3. Contenido de FB ₁ , SN y PS en fracciones membranales de embriones de maíz embebidos durante 24 h en 10 ó 20 μ M de FB ₁	45

La NADPH oxidasa es un complejo de enzimas membranales y citosólicas que cataliza la reacción de explosión oxidativa, una rápida y transitoria producción de cantidades masivas de especies reactivas de oxígeno (ERO), mismas que participan en las reacciones de defensa ante el ataque de patógenos en mamíferos. A diferencia de su amplio conocimiento en células animales, éste fenómeno fue demostrado en plantas más recientemente, observándose que las ERO producidas pueden servir como protección contra patógenos invasores y como activadores de señales para posteriores reacciones de defensa de la planta. En células de *Nicotiana tabacum* y *Lycopersicon esculentum* se ha reportado la existencia de homólogos para la subunidad gp91^{phox}, la subunidad catalítica de la NADPH oxidasa de mamíferos, que tienen la misma actividad que la enzima de neutrófilos. Se ha encontrado que, al igual que en mamíferos, el radical superóxido, uno de los productos de la reducción secuencial del oxígeno molecular durante la reacción de explosión oxidativa, es la especie primaria detectada en la mayoría de los sistemas vegetales. La velocidad de producción de ERO por células evocadas es similar en mamíferos y en plantas y su generación puede ser inhibida por DPI, un inhibidor de la NADPH oxidasa de mamíferos. No se han reportado homólogos de esta enzima o sus subunidades en células de maíz (*Zea mays*).

Basados en que en la literatura hay evidencias que implican a los esfingolípidos en las reacciones de defensa de plantas ante patógenos, en este trabajo se estudió el efecto de la fumonisina B₁ (FB₁), (un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos complejos), de esfinganina (SN) y de fitoesfingosina (PS) a embriones de maíz durante 24 h y de los cuales se aislaron fracciones microsomales y de membrana plasmática. En estas últimas, se midió la reducción de NBT y XTT para medir la formación del radical superóxido en solución y también en gel, a partir de la separación electroforética de las proteínas membranales.

Se encontró que la reacción de reducción de NBT o XTT debida a fracciones de membrana plasmática de embriones de *Z. mays* fue dependiente de NADPH e inhibida efectivamente por DPI y por la acción de la enzima superóxido dismutasa. La adición *in vivo* de compuestos esfingoideos, principalmente FB₁ y SN, a embriones de *Z. mays* afectó la reacción en función de la concentración: 10 µM de FB₁ disminuyó el nivel de reducción de los compuestos de tetrazolio, mientras que 20 µM, la incrementaron. Además, se encontró que membranas de embriones que fueron embebidos 3 h en presencia de compuestos esfingoideos mostraron un incremento en la producción del radical superóxido. En el ensayo en gel se detectó una banda principal de proteína que cataliza la reducción de NBT dependiente de NADPH con un peso molecular aproximado de

63 kDa. Esta banda pudo ser reconocida por un anticuerpo diseñado contra la porción del extremo carboxilo terminal de varias NADPH oxidasas de plantas.

El efecto de estimulación de la actividad de NADPH oxidasa de células vegetales por FB₁, SN y PS se suma a otras reacciones inducidas por compuestos esfingoideos encontradas previamente en nuestro laboratorio y en la literatura y que están relacionadas con los mecanismos de defensa contra patógenos presentados por una planta.

2.1.1 Mecanismos de resistencia ante el ataque de patógenos en plantas

Cada especie vegetal puede ser atacada por muchos tipos diferentes de patógenos, tales como hongos, bacterias, virus, nemátodos e insectos, los cuales interceptan los productos de la fotosíntesis producidos por las plantas o usan su maquinaria de replicación. Las plantas no pueden moverse para escapar a estos ataques, por lo que han desarrollado sofisticados mecanismos para percibirlos y transducir esa percepción en respuestas adaptativas (Dangl y Jones, 2001).

La mayoría de las plantas son resistentes a la mayoría de los patógenos vegetales, éstos últimos pueden dividirse, de manera general en aquellos que matan al hospedero y se alimentan de su contenido (necrótrofos) y aquellos que requieren un hospedero vivo para completar su ciclo de vida (biótrofos). La necrotrofia microbiana es acompañada frecuentemente por la producción de toxinas. Los virus son esencialmente biótrofos, aunque la infección puede llevar a la muerte de la célula hospedera. Las bacterias y los hongos pueden adoptar ambos estilos de vida (Dangl y Jones, 2001). Los términos “planta no hospedera” y “patógeno no hospedero” se refieren al hecho de que los patógenos tienen un intervalo limitado de plantas en las cuales pueden causar enfermedad. Con frecuencia, únicamente plantas de un solo género son hospederas para un patógeno particular; este es el caso de muchos mohos y patógenos bacterianos. El resto de las plantas son, por definición: “plantas no hospederas” y los microbios que las atacan son “patógenos no hospederos”. La resistencia de los no hospederos es altamente efectiva y durable, y por lo tanto, se ha sugerido frecuentemente que los mecanismos de resistencia de no hospederos pueden ser explotados para generar cultivos de plantas resistentes. La figura 1 representa una lista simplificada de los obstáculos que el patógeno debe vencer antes de tener éxito para causar enfermedad (Thordal-Christensen, 2003).

El éxito de una planta para combatir a un patógeno microbiano puede depender de su expansión. La movilización temprana de reacciones de defensa puede ser crítica si la planta utiliza sus defensas bioquímicas y estructurales disponibles para detener al patógeno invasor. Si la planta falla al hacer esto, los mecanismos de defensa apropiados serán activados demasiado tarde y el patógeno inicia la colonización de los tejidos de la planta (Dangl y Jones, 2001).

En general, las plantas se defienden contra los patógenos de dos maneras: 1) características estructurales que actúan como barreras físicas que dificultan la entrada del patógeno y evitan su expansión a través de la planta y 2) reacciones bioquímicas que toman lugar en las células y tejidos de la planta y producen sustancias que puede ser tóxicas al patógeno o

crean condiciones que inhiben su crecimiento dentro de la misma. La combinación de características estructurales y reacciones bioquímicas empleadas en la defensa de las plantas son diferentes en los diferentes sistemas patógeno-hospedero. Adicionalmente, aún dentro del mismo patógeno y hospedero la combinación varía con la edad de la planta, el tipo de órgano y tejido afectado, las condiciones nutrimentales de la planta y las condiciones ambientales.



Figura 1. Vista simplificada de la problemática de la interacción planta patógeno. Se indican las etapas en las cuales pueden manifestarse ya sea la resistencia del hospedero o el ser no hospedero (Thordal-Christensen, 2003).

Entre las primeras se encuentran cutículas de cera, la pared celular, el tamaño, forma y localización de estomas y la presencia de pelos en la superficie de la planta que pueden ejercer también efectos repelentes al agua. Además, la planta cuenta con defensas químicas preexistentes, éstas defensas incluyen tanto a los inhibidores liberados por la planta en su ambiente y que pueden actuar como inhibidores contra el crecimiento de ciertos patógenos y los inhibidores presentes en las células vegetales antes de la infección, entre éstos se encuentran varios compuestos fenólicos, taninos y algunos compuestos parecidos a los ácidos grasos como dienos, muchos de tales compuestos son potentes inhibidores de muchas enzimas hidrolíticas presentes en algunos patógenos vegetales (Agrios, 1997).

Además de las barreras estructurales que limitan la expansión de un patógeno, la planta debe ser capaz de generar defensas bioquímicas y estructurales que limiten la expansión del patógeno. El reconocimiento temprano de un patógeno por la planta es muy importante para que la planta pueda movilizar estas defensas. Aparentemente, la planta comienza a recibir moléculas de señalización que indican la presencia del patógeno, tan pronto como éste establece contacto físico con la planta. Varios patógenos, especialmente hongos y bacterias liberan en su ambiente inmediato una gran variedad de sustancias tales como glicoproteínas, carbohidratos, ácidos grasos y péptidos, en varias combinaciones patógeno hospedero, algunas de estas sustancias actúan como evocadores de reconocimiento por la planta. Una vez que una molécula particular de la planta reconoce y reacciona con una molécula derivada del patógeno (elicitor) se asume que la planta “reconoce” al patógeno. Posterior al reconocimiento, una serie de reacciones bioquímicas y cambios estructurales son puestos en movimiento en la(s) célula (s) de la planta en un esfuerzo para rechazar al patógeno y sus enzimas, toxinas, etc. La rapidez del reconocimiento por parte de la planta de la presencia de un patógeno y la rapidez con la que pueda enviar señales de alarma y movilizar sus defensas, determinará si una infección tomará lugar o qué tanto se desarrollará el patógeno antes de que las defensas finalmente sean detenidas y avance el desarrollo del patógeno (Agrios, 1997).

Las interacciones planta-patógeno, particularmente aquellas que involucran parásitos biótrofos, están gobernadas por interacciones específicas entre genes de avirulencia (*avr*) del patógeno y alelos del correspondiente gen de resistencia a la enfermedad de la planta (*R*). Cuando los correspondientes genes *R* y *avr* están presentes tanto en el hospedero como en el patógeno, el resultado es la resistencia a la enfermedad, si alguno de los dos está ausente, el resultado es la enfermedad (Flor, 1971). El modelo más simple que explica esta interacción requiere que los productos del gen *R* reconozcan las señales dependientes del gen *avr* y desencadenen una cadena de eventos de transducción de señales que culmine en la activación

de los mecanismos de defensa y en la detención del crecimiento del patógeno (Dangl y Jones, 2001).

2.1.2 Transmisión de señales de alarma al hospedero

Una vez que los elicitores derivados del patógeno son reconocidos por el hospedero, una serie de señales de alarma son enviadas a las proteínas del hospedero y al núcleo causando que se activen, para producir sustancias inhibitorias al patógeno y para movilizarse a sí mismo o a sus productos hacia el punto de ataque de la célula por el patógeno. Algunas de las sustancias de alarma y transducción de señales son únicamente intracelulares, aunque en muchos casos la señal también es transmitida a varias células adyacentes y, aparentemente, con frecuencia se transmite sistémicamente a toda la planta.

Varios tipos de moléculas han sido implicados en la transducción de señales intracelulares. Las más comunes parecen ser varias proteínas cinasas, iones calcio, fosforilasas y fosfolipasas, ATPasas, peróxido de hidrógeno, etileno y otros. La transducción de señales sistémicas que lleva a la resistencia sistémica adquirida, se piensa que es llevada a cabo por el ácido salicílico, oligogalacturonidos liberados de las paredes celulares de la planta, ácido jasmónico, sistemina, ácidos grasos, etileno y otros.

2.1.3 Defensas estructurales inducidas

Algunas de las defensas estructurales formadas involucran cambios en el citoplasma de la célula (por ejemplo de densidad o morfología), que pueden hacer que la invasión se detenga; otras involucran la pared celular de la célula invadida y finalmente la muerte de la célula invadida puede proteger a la planta de posteriores invasiones, a este fenómeno se le conoce como la respuesta de hipersensibilidad (HR), ésta se ilustra en la figura 2 (Agrios, 1997).

2.1.4 Respuesta de hipersensibilidad

La respuesta de hipersensibilidad consiste en una rápida muerte celular en y alrededor del sitio de infección inicial, esto es, grandes sectores de la hoja que favorecen la absorción de agua al inicio y, subsecuentemente mueren y se colapsan dentro de las siguientes 8 a 12 horas después de la inoculación, generalmente está acompañada por la inducción de respuestas de defensa por parte de la planta que sirven para confinar al patógeno y proteger al resto de la planta. Esta respuesta está asociada con la restricción del crecimiento del patógeno y representa una forma de muerte celular programada (Lam *et al.*, 2001). Aunque la HR es una característica común de muchas reacciones de resistencia, no es un componente obligado de las mismas, de hecho, algunos patógenos pueden ser resistidos efectivamente sin recurrir a la HR y se ha sugerido que ésta representa una etapa final de las respuestas de resistencia que es evocada únicamente si un cierto umbral en las señales celulares de defensa es alcanzado (Morel y Dangl,

1997). Una HR efectiva puede no siempre ser visible cuando la planta sigue siendo resistente al ataque por un patógeno, puesto que es posible que involucre una sola célula o muy pocas y por lo tanto no ser notada.

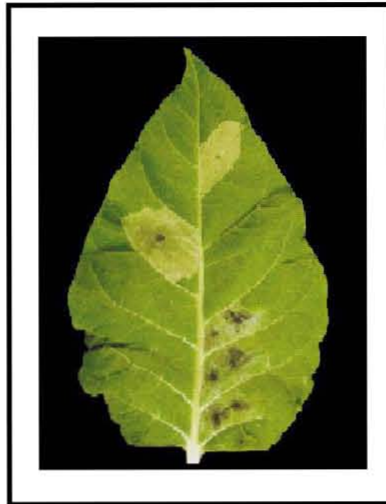


Figura 2. Respuesta de hipersensibilidad presentada por una planta.

Esta reacción es la culminación de las respuestas de la planta iniciadas por el reconocimiento por parte de la misma de moléculas elicitoras derivadas del patógeno. El reconocimiento de tales compuestos activa una cascada de reacciones bioquímicas en las células vegetales atacadas y en las que la rodean y lleva a nuevas o alteradas funciones celulares y a nuevos o grandemente activados compuestos relacionados con la defensa. Las más comunes incluyen una rápida explosión de reacciones oxidativas; incremento de movimiento de iones, especialmente K^+ y H^+ a través de la membrana celular; destrucción de membranas y pérdida de compartimentalización celular; entrecruzamiento de compuestos fenólicos con componentes de la pared celular y reforzamiento de la misma (lignificación, entrecruzamiento de proteínas estructurales); producción de sustancias antimicrobianas tales como fitoalexinas; y formación de proteínas antimicrobianas llamadas “relacionadas con la patogénesis”.

Una característica de la HR es la rápida y transitoria producción de enormes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ERO), la cual ha sido considerada un evento central de la resistencia a la enfermedad. Crecientes evidencias sugieren que las ERO, tales como peróxido de hidrógeno y superóxido constituyen la primera línea de defensa en la resistencia a la enfermedad en plantas, ya sea matando directamente al patógeno o deteniendo su ingreso debido a la rapidez de su producción y citotoxicidad. Las ERO también toman parte en otros mecanismos de resistencia, por ejemplo: reforzamiento de la pared celular y producción de fitoalexinas. La

acumulación de ERO, especialmente H_2O_2 durante algunas interacciones planta patógeno lleva a la acumulación de ácido salicílico, un importante compuesto de defensa que se requiere en la respuesta de hipersensibilidad y en la respuesta sistémica adquirida. Esta respuesta es característica en muchas interacciones hongo-hospedero.

Se ha propuesto que las ERO son generadas por una NADPH oxidasa de la membrana plasmática de la célula hospedera y al parecer son liberadas a los pocos segundos o minutos de que la célula entra en contacto con el hongo o sus evocadores y alcanzan una actividad máxima a los pocos minutos o unas pocas horas. Las ERO desencadenan la hidroperoxidación de fosfolípidos membranales, produciendo mezclas de lípidos hidroperoxidados, los cuales son tóxicos y su producción destruye las membranas celulares de la planta. Las ERO también pueden estar involucradas en las reacciones de defensa del hospedero a través de la oxidación de compuestos fenólicos a quinonas (más tóxicas) y compuestos similares a lignina.

2.1.5 Reforzamiento de la pared celular del hospedero con moléculas reforzadoras

En varias enfermedades causadas por hongos, las paredes de las células que entran en contacto con el hongo producen, modifican o acumulan sustancias relacionadas con la defensa que refuerzan la resistencia de la pared celular a la invasión por el patógeno. Entre las sustancias defensivas producidas o depositadas en la pared celular están la callosa, glicoproteínas tales como extensina que son ricas en el aminoácido hidroxiprolina, compuestos fenólicos de complejidad variada incluyendo lignina y suberina y elementos minerales tales como silicio y calcio. Algunas de estas sustancias también son producidas o depositadas en estructuras defensivas de la pared celular tales como las papilas. Muchas de estas sustancias forman polímeros complejos y también reaccionan y se entrecruzan con otras formando estructuras de pared celular más o menos insolubles que confinan al hongo invasor y previenen el desarrollo de posteriores enfermedades.

2.1.6 Resistencias local y sistémica

Se ha sabido por muchos años, que las plantas desarrollan una resistencia generalizada en respuesta a la infección por un patógeno o al tratamiento con ciertos compuestos químicos naturales o sintéticos. La resistencia inducida se localiza primero alrededor del punto de necrosis vegetal causada por la infección del patógeno o la sustancia química y se conoce como resistencia local adquirida. Subsecuentemente, la resistencia se esparce sistémicamente y desarrolla en partes distales no tratadas de la planta, lo que se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR). La SAR actúa de manera no específica a través de la planta y reduce la severidad de la infección causada por toda clase de patógenos, incluyendo los normalmente virulentos, en general, se produce posteriormente a la expresión de la HR. El grado de SAR

parece correlacionarse con el número de lesiones producidas, sin embargo, no puede generarse después del inicio de la floración y producción de frutos en la planta hospedera. En algunos sistemas patógeno-hospedero, la SAR se caracteriza por la inducción de la actividad de peroxidasa y lipooxigenasa que llevan a la producción de derivados de ácidos grasos que exhiben fuerte actividad antimicrobiana. El ácido salicílico parece estar involucrado tanto en la HR como en la SAR, pero puede no ser la señal que induce ésta última. El SA está presente en el floema de las plantas después de la primera inoculación pero antes del inicio de la resistencia adquirida, la concentración de sus niveles se correlaciona con la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis y la aplicación externa de SA activa la misma serie de genes SAR que se expresan después de la inducción de SAR por patógenos. Se ha reportado que el SA reacciona con una enzima oxidativa (catalasa) y genera ERO y se ha sugerido como un mecanismo por el cual la célula vegetal reacciona a la señalización por SA e induce SAR.

2.2 Especies Reactivas de Oxígeno

Las ERO son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico a las cuales se generan a partir de la reducción secuencial del oxígeno molecular, las especies predominantes detectadas durante las interacciones planta patógeno incluyen: al radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), (Wojtaszek, 1997). El primer producto de la reducción del O_2 es el radical superóxido a partir del cual se pueden formar otras ERO en los sistemas vivos, como el H_2O_2 , que se produce por la dismutación del radical superóxido (Fridovich, 1975):



Otras ERO incluyen al ácido hipocloroso (HOCl), el cual se genera por la oxidación del ión cloruro (Cl^-) mediada por H_2O_2 , una reacción catalizada por la mieloperoxidasa (MPO) (Kanofsky, 1989). En mamíferos, los eosinófilos catalizan la producción de HOBr o HOSCN , a través de una peroxidasa única. El oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$) se forma cuando los dos electrones desapareados del oxígeno molecular se aparean, de esta manera, incrementan su reactividad haciendo al O_2 susceptible de donar electrones en diferentes configuraciones de espín, éste se puede generar a través de la reacción de HOCl y H_2O_2 (Steinbeck *et al.*, 1992; Steinbeck *et al.*, 1993). Otras ERO son el ozono (O_3), cuyo origen no ha sido establecido con claridad (Nathan C, 2002; Wentworth *et al.*, 2002; Babior *et al.*, 2003; Lerner y Eschemoser, 2003) y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), del que se ha postulado surge de la oxidación de metales reducidos (Fe^{2+} o Cu^+) por H_2O_2 . Sin embargo, los metales reducidos libres son muy escasos en los sistemas biológicos, aunque Fe^{2+} puede ser liberado de los centros de hierro-azufre por el radical superóxido (Hausladen y Fridovich, 1994). Otra fuente probable de radical hidroxilo es la reacción entre ozono y H_2O_2 . La reactividad de los

radicales libres causa que éstos sustraigan H^+ o transfieran electrones a otras moléculas, dando lugar a la formación de más radicales libres.

Las ERO tienen diferentes reactividades y diferentes capacidades para moverse a través de la célula. Como un reductor relativamente fuerte, el radical superóxido puede actuar ya sea como reductor u oxidante, dependiendo del potencial de oxidación-reducción de la molécula reaccionante. Aunque es un precursor de especies más reactivas, el radical superóxido reacciona con un repertorio limitado de blancos químicos, tales como los centros de hierro azufre que funcionan como acarreadores de electrones en la cadena respiratoria de bacterias y mitocondrias. Además, la reactividad y movilidad de esta especie varían dependiendo del pH; las especies protonadas reaccionan más rápidamente, se pueden mover a través de membranas y dismutar a H_2O_2 más rápidamente que la forma desprotonada. Es más probable que el $\cdot O_2^-$ se encuentre protonado en el apoplasto que el en citoplasma, pues el primero tiene un pH de entre 5 y 6, mientras que el citoplasma tiene pH neutro (Green y Hill, 1984; Felle, 1998; Mühling *et al.*, 1995).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un oxidante más potente y es más reactivo, aunque sus blancos son aún más limitados e incluyen metionina y ciertos residuos de cisteína altamente reactivos tales como aquellos que se encuentran en el sitio activo de algunas enzimas. La oxidación de tales cisteínas inactiva enzimas tales como la proteína tirosina fosfatasa (Lee *et al.* 1998). Además, al ser una molécula sin carga puede moverse a través de las membranas. Las peroxidasas usan H_2O_2 para producir oxidantes altamente reactivos, ya sea en el sitio activo o como oxidantes discretos difundibles tales como el ácido hipocloroso (HOCl). El HOCl lleva a cabo una amplia variedad de reacciones oxidativas, incluyendo cloración de tirosinas y la modificación oxidativa (y frecuentemente inactivación) de enzimas.

Los radicales hidroxilo son altamente reactivos con varias biomoléculas, son iniciadores de reacciones de radicales libres en cadena que producen marcado daño oxidativo.

El oxígeno en singulete y el ozono tienen, por igual, alta reactividad, por ejemplo hacia dobles enlaces en ácidos grasos insaturados. Sin mieloperoxidasa, muchas de las especies más reactivas no se forman, de esta manera, más que daño molecular generalizado, las ERO producidas en tejidos no inmunes oxidarán un espectro más limitado de moléculas blanco y éstas oxidaciones más específicas pueden ser usadas para funciones biológicas específicas. La figura 3 es un esquema simplificado de la formación y reactividad de estas especies.

El estrés oxidativo es una situación fisiológica súbita generada por un estímulo externo o interno y que causa la aparición de ERO. Éste ha representado un reto para los organismos desde los inicios del metabolismo aerobio, el cual creó un incremento en la presión parcial del oxígeno en la atmósfera, hace aproximadamente dos mil quinientos millones de años (Reinbothe *et*

al.,1996). Desde entonces, los organismos se han adaptado para deshacerse de las ERO generadas como subproducto del metabolismo o como productos del estrés ambiental, percibiendo su presencia y activando rutas de transducción de señales específicas como respuesta para contender con ellas (Mach y Greenberg, 2004). Probablemente debido al temprano descubrimiento de enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y peroxidasas que eliminan las ERO de la célula, las investigaciones durante las pasadas tres décadas asumieron generalmente que éstas son producidas “accidentalmente” en las células y que era importante para ellas eliminar estas especies oxidantes. Este punto de vista fue reforzado por estudios químicos que establecieron que, bajo ciertas condiciones, el radical superóxido y el H_2O_2 reaccionan para generar radicales hidroxilo. Éstas y otras ERO de corta vida reaccionan de manera no específica y rápidamente con biomoléculas, incluyendo DNA, proteínas, lípidos y carbohidratos. Varias investigaciones han dilucidado roles para las ERO como causantes de daño molecular, tales como mutaciones de DNA, peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas. Como resultado de estos estudios, las ERO han sido vistas históricamente como una consecuencia inevitable y peligrosa de un estilo de vida aerobia.

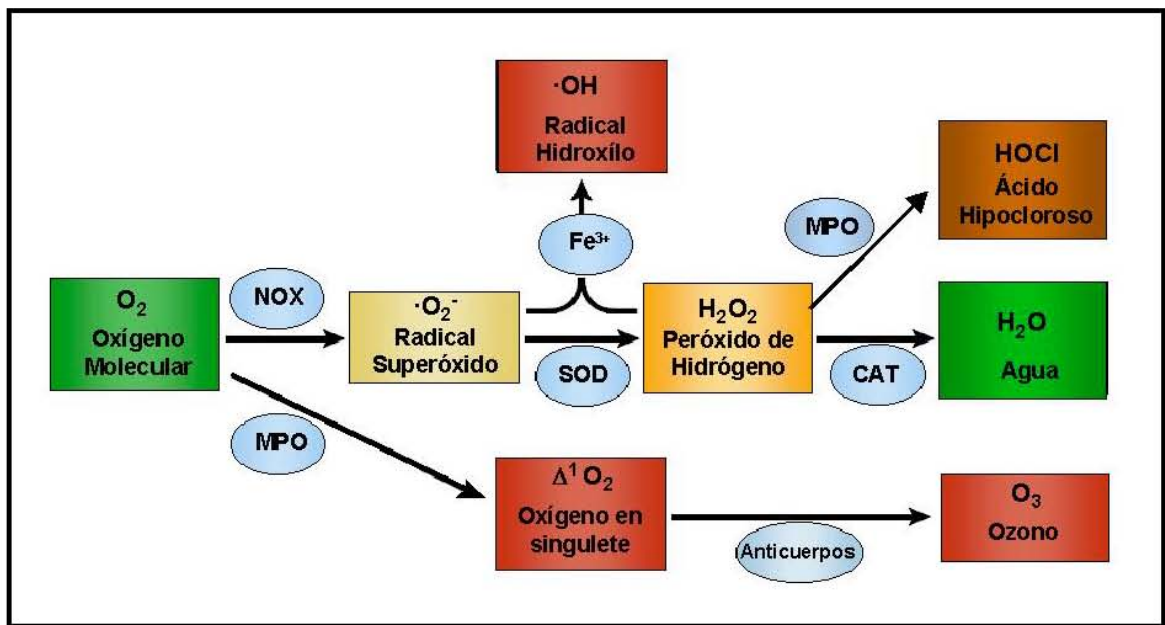


Figura 3. Esquema simplificado de la generación y reactividad de varias ERO, el oxígeno molecular es muy estable, el radical superóxido tiene reactividad limitada, el peróxido de hidrógeno es moderadamente reactivo, tanto el radical hidroxilo, como el oxígeno en singlete, el ozono y el ácido hipocloroso son altamente reactivos y no específicos (Lambeth, 2004).

El descubrimiento de enzimas cuya única función bioquímica es la de producir ERO indica que las enzimas catabólicas de estas especies pueden entenderse mejor como únicamente un componente de un sistema que está diseñado para regular los niveles celulares de las mismas (Lambeth, 2004). Muchos organismos han desarrollado también una producción controlada de ERO para dirigirla a un uso como moléculas de señalización y de defensa. De hecho, tanto plantas como animales las producen como parte de sus mecanismos de defensa ante el ataque de patógenos. De esta manera, las ERO son un subproducto metabólico tóxico que debe ser eliminado, pero también, un grupo importante de moléculas de señalización y un arma en el arsenal contra el ataque de patógenos.

Hasta hace poco, el único ejemplo de la generación “deliberada” de ERO en células de mamíferos era la NADPH oxidasa (NOX) de fagocitos (Phox) que cataliza la reacción de “explosión oxidativa”. Esta oxidasa está inactiva en neutrófilos en reposo, pero se activa por la exposición a microorganismos o mediadores inflamatorios, resultando en la producción no mitocondrial de ERO (Baldrige y Gerard, 1933; Sbarra y Karnovsky, 1959).

2.3 Características de la NADPH oxidasa de mamíferos

La NADPH oxidasa es un complejo enzimático que se encuentra principalmente en los neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos (Segal *et al.*, 1981), y cuya función primordial es proporcionar agentes que destruyan a los patógenos que atacan al organismo (Babior, 2004). Consta de dos subunidades unidas a la membrana: gp 91^{phox} y p22^{phox}, (phox, de phagocyte oxidase), las cuales forman lo que se conoce como flavocitocromo b₅₅₈; tres componentes citosólicos: p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox} y una proteína G de bajo peso molecular (rac 1 o rac 2) (Babior, 1999). Las proteínas rac se mantienen inactivas por unión a un inhibidor de la disociación del nucleótido guanina (guanine nucleotide dissociation inhibitor), el cual previene el intercambio de nucleótidos de guanina a partir de las proteínas rac (Schalk *et al.*, 1996). La activación de la NADPH oxidasa está asociada con la migración de las subunidades citosólicas a la membrana plasmática, de tal manera que el complejo activo pueda ser ensamblado (figura 4). La oxidasa es específica para NADPH, el nucleótido de piridina donador de electrones y trabaja pobremente con NADH. Los electrones del NADPH se transfieren a través de una cadena redox dentro de la enzima al oxígeno molecular para generar al radical superóxido, de acuerdo con la siguiente reacción:



El flujo de electrones es electrogénico y despolariza rápidamente a la membrana. La despolarización excesiva puede detener el transporte de electrones por auto-inhibición, esto puede ser prevenido por un flujo de protones que balancea el flujo de electrones. El flujo de

protones es mediado por una ruta distinta y separada, la composición de la cual no ha sido identificada (DeCoursey *et al.*, 2001). Aunque el potencial de membrana se despolariza por ≈ 100 mV durante la explosión oxidativa (actividad de NADPH oxidasa), la actividad de la enzima es independiente de voltaje en este intervalo, lo cual permite su funcionamiento óptimo y previene su auto inhibición (DeCoursey, 2003).

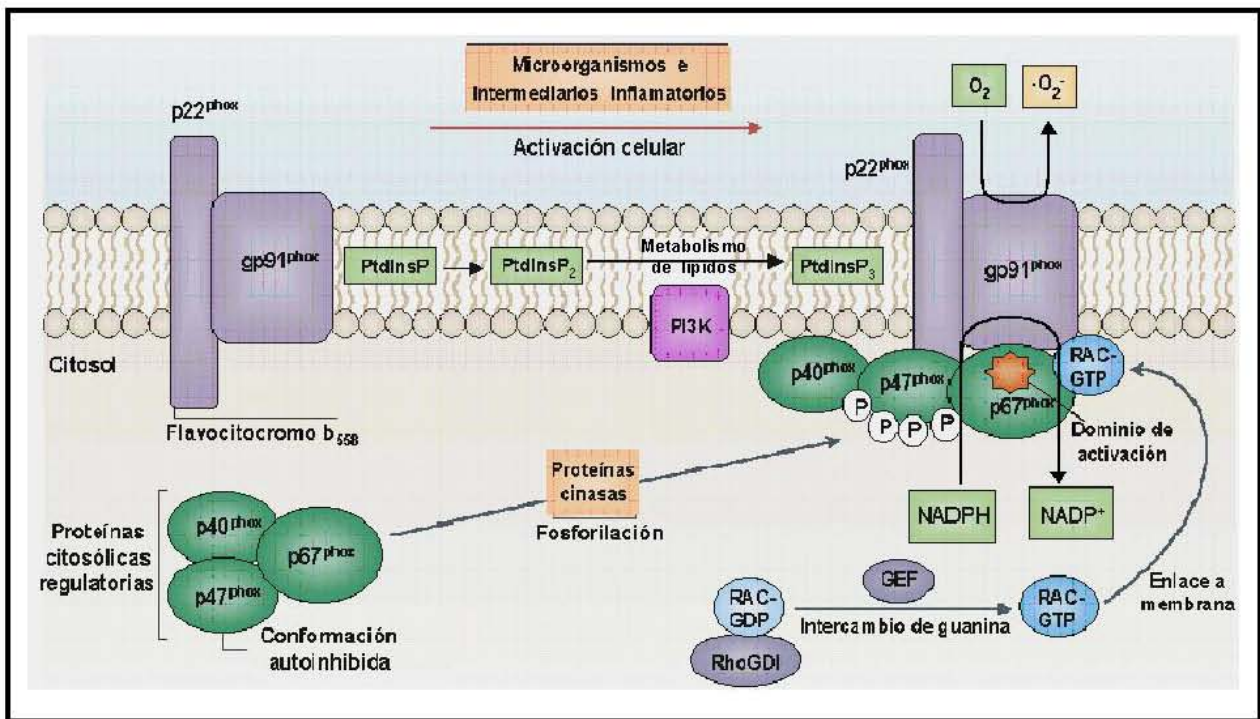


Figura 4. Activación de la NADPH oxidasa de neutrófilos (Lambeth, 2004).

2.3.1 Conformación de NOX2, la subunidad catalítica de la NADPH oxidasa en mamíferos

La subunidad catalítica de la NADPH oxidasa, gp91^{phox} (también conocida como NOX2), es una proteína integral de membrana de 570 aminoácidos; en el extremo amino terminal se encuentra un dominio hidrofóbico para el que se han predicho seis hélices α transmembranales (Roger-Pokora *et al.*, 1986; Henderson *et al.*, 1997). A esta región se encuentran asociados los dos grupos hemo presentes en la molécula. El hemo es un grupo prostético que contiene hierro, el cual es capaz de sufrir reducción y reoxidación, por lo tanto funciona como un acarreador de electrones. Los dos hemos se localizan aproximadamente dentro de las dos capas lipídicas de la membrana plasmática (Cross *et al.*, 1995) y juntos proporcionan un canal para que los electrones pasen a través de ella; sus potenciales de reducción son muy bajos, se encuentran

hexacoordinados (Fujii *et al.*, 1995a; Fuji *et al.*, 1995b) y se unen a través de los residuos de histidina 101, 115, 209 y 222, localizados en las hélices III (101 y 115) y V (209 y 222) (Biberstine-Kinkade *et al.*, 2001). La porción del carboxilo terminal de la molécula se dobla en un dominio citoplásmico independiente que contiene sitios de unión para el grupo prostético flavina adenina dinucleótido (FAD) (Rotrosen *et al.*, 1992; Segal *et al.*, 1992) y el sustrato NADPH.

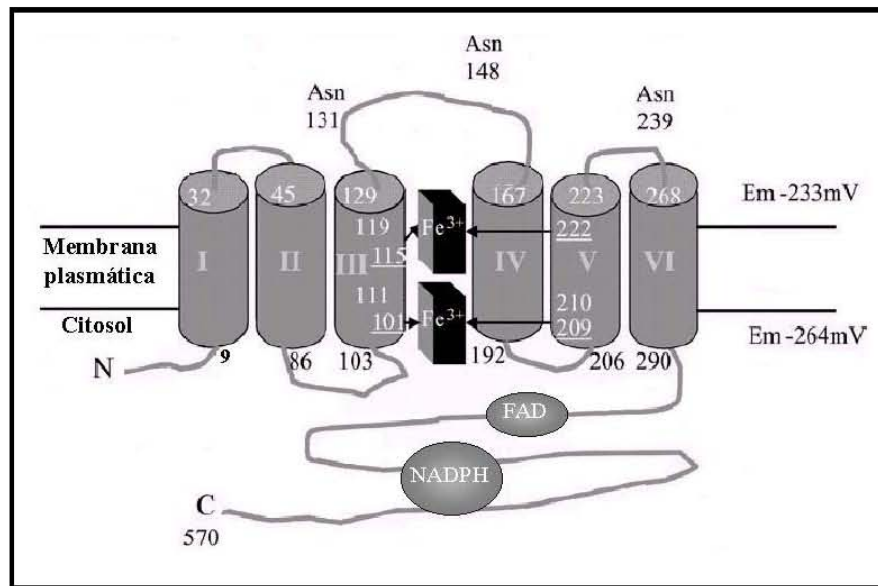


Figura 5. Estructura de gp91^{phox}/NOX2 (Paclet, *et al.*, 2004).

La subunidad gp91^{phox} de leucocitos de humano es una proteína altamente glucosilada y puede ser detectada en réplicas en Western como una banda ancha entre 120 a 60 kDa; el tratamiento del citocromo b₅₅₈ purificado con N-glucosidasa F lleva a una banda específica con una masa molecular desde 91 kDa hasta 55 kDa (Paclet *et al.*, 2000; Paclet *et al.*, 2001). Se ha mostrado que los sitios de glucosilación se encuentran en el N-terminal (Harper *et al.*, 1985), en los residuos de Asn¹³¹ y Asn¹⁴⁸ localizados en la asa predicha entre las hélices III y IV y en Asn²³⁹, entre las hélices transmembranales V y VI de gp91^{phox} (Wallach y Segal, 1997). La figura 5 muestra una representación de la estructura de esta proteína.

2.3.2 Regulación de la NADPH oxidasa

La regulación a corto plazo de la NADPH oxidasa involucra a la subunidad p22^{phox} y a las subunidades citosólicas p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox}, así como a la pequeña GTPasa rac (Vignais, 2002). p22^{phox} forma un complejo mutuamente estabilizante con gp91^{phox} y su extremo carboxilo contiene una secuencia rica en prolinas que sirve como sitio de unión para los dos dominios de homología SRC3 (bis-SH3) de p47^{phox} (Ago *et al.*, 2003; Groemping *et al.*, 2003).

Bajo condiciones de reposo, una región autoinhibitoria en p47^{phox} se combina con el dominio bis-SH3 impidiendo su unión a p22^{phox} (Ago *et al.*, 2003). Aunque menos bien entendido, el dominio SH3 del carboxilo terminal también parece interactuar con el dominio de homología Phox (PX), probablemente a través de la secuencia rica en prolina en el dominio PX. Esta interacción inhibe la unión del dominio PX a lípidos de membrana (Ago *et al.*, 2003). p47^{phox} se asocia en el citosol a p40^{phox} y p67^{phox}, mientras rac está unida a la proteína inhibitoria RhoGDP inhibidora de disociación (RhoGDI).

La activación celular por microorganismos o mediadores inflamatorios inicia al menos tres disparadores moleculares (fosforilación de proteínas, metabolismo de lípidos e intercambio del nucleótido guanina en rac), que juntos resultan en la translocación membranal y ensamble de los componentes citosólicos con el flavocitocromo. Una función clave del ensamble de las subunidades es yuxtaponer el dominio de activación de p67^{phox} de tal manera que entre en contacto con una región del citocromo b₅₅₈ (Han *et al.*, 1998; Nisimoto *et al.*, 1999). El dominio de activación de p67^{phox} activa la transferencia de electrones del NADPH al FAD, el cual es el paso determinante de la velocidad en la generación de superóxido. Este complejo de regulación múltiple previene la activación accidental de la oxidasa. Los neutrófilos pueden transitar desde niveles no detectables de ERO, hasta la producción de altos niveles de los mismos dentro de los 30 segundos posteriores a la activación.

2.4 Especies reactivas de oxígeno en plantas

2.4.1 Generación de ERO en plantas

Los radicales libres y las ERO se forman durante el metabolismo aerobio normal, estrés ambiental, senescencia y en la respuesta de plantas al ataque de patógenos (Wojtaszek, 1997). Las fuentes celulares de ERO incluyen cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Del Río *et al.*, 1992); estos organelos contienen enzimas antioxidantes para remover las ERO producidas *in situ*.

2.4.2 Estrés abiótico

El estrés oxidativo juega un papel muy importante en las respuestas a estrés ambiental, tales como heladas, sequía, heridas y exposición a dióxido de azufre, metales pesados, ozono o exceso de luz (Noctor y Foyer, 1998). Las ERO pueden generarse por diferentes mecanismos durante este tipo de estrés, pero causan la inducción de repuestas adaptativas comunes, tales como el incremento en la producción de enzimas antioxidantes. La sobrevivencia al estrés oxidativo puede depender no tanto de la severidad del estrés, como de la presteza de la respuesta antioxidante.

2.4.3 Explosión oxidativa en plantas

Desde que Doke (1983) reportó por primera vez la generación de anión superóxido durante las interacciones incompatibles (resistencia de la planta) entre plantas de papa y el patógeno *Phytophthora infestans*, las ERO han sido detectadas repetidas veces en respuestas de resistencia a patógenos. Como parte de la respuesta de resistencia a la enfermedad de una planta, la célula vegetal libera $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 en respuesta al reconocimiento de un elicitador específico del patógeno. Las ERO producidas pueden actuar directamente destruyendo al patógeno y como inductores de varias respuestas en la planta, incluyendo el entrecruzamiento de la pared celular, muerte celular programada (respuesta de hipersensibilidad o HR) y expresión de genes de defensa en el área adyacente.

Existen evidencias de dos diferentes mecanismos que generan la explosión oxidativa. En la primera, la producción apoplástica de H_2O_2 dependiente de pH está mediada por peroxidasas de pared celular (Bolwell *et al.*, 1995; Bestwick *et al.*, 1997; Bestwick *et al.*, 1999), oxalato oxidasas o amino oxidasas (Apel y Kirt, 2004; Mittler *et al.*, 2004). El segundo mecanismo de generación de ERO detectado en plantas después del reconocimiento satisfactorio de un patógeno es la generación de superóxido catalizada por una NADPH oxidasa unida a la membrana plasmática similar a la responsable de la explosión oxidativa en fagocitos de mamíferos, en que el superóxido es el radical primario en la mayoría de los sistemas (Doke, 1983; Auh y Murphy, 1995; Jabs *et al.*, 1997); además, la velocidad de producción de ERO por células elicidadas es similar en mamíferos y en plantas (Low y Merida, 1996); y finalmente, la generación de ERO puede ser inhibida por DPI, un inhibidor de la NADPH oxidasa de mamíferos (y en general de enzimas que contienen flavina) (Murphy y Auh, 1996; Jabs *et al.*, 1997). La síntesis de superóxido dependiente de NADPH se ha observado en extractos de membrana plasmática de cultivos de células de rosa (Murphy y Auh, 1996), tabaco y jitomate (Sagi y Fluhr, 2001). Otras evidencias para este mecanismo de generación de ERO surgen del aislamiento de proteínas similares a la subunidad gp91^{phox} de la NADPH oxidasa de mamíferos en células de *Arabidopsis* y arroz (Keller *et al.*, 1998).

El H_2O_2 se produce probablemente por los dos mecanismos mencionados previamente, pero en diferentes grados según los diferentes sistemas (Bestwick *et al.*, 1999). Además, ambos sistemas pueden operar de manera sinérgica durante la explosión oxidativa, con el consumo de H^+ requerido para la dismutación del superóxido causando un incremento en el pH extracelular (Wojtaszeck, 1997). Este incremento de pH, junto con el producido por la apertura de canales iónicos, activa la peroxidasa de pared celular dependiente de pH. Otra sugerencia interesante es que la ATPasa de protones, activada más lentamente que la explosión oxidativa, puede acidificar el espacio extracelular y terminar la producción de ERO.

2.4.4 La NADPH oxidasa codificada por *Rboh* de células vegetales

El primer gen identificado que codifica para NADPH oxidasa en plantas fue el gen *OsrbohA* de arroz, el cual está relacionado a la subunidad gp91^{phox} de la NADPH oxidasa de mamíferos (Groom *et al.*, 1996). Estudios subsecuentes documentaron diferentes genes homólogos a la oxidasa de la explosión oxidativa (*Respiratory burst oxidase homolog, Rboh*) en otras especies, incluyendo *Arabidopsis*, jitomate, tabaco y papa (Keller *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1998; Amicucci *et al.*, 1999; Yoshioka *et al.*, 2001; Simon-Plas *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2003). No se encontraron homólogos de p47^{phox} o p67^{phox} en el genoma de *Arabidopsis* (Dangl y Jones, 2001) y los reportes iniciales (Dwyer *et al.*, 1996) de que anticuerpos contra dichas subunidades de mamíferos reconocían proteínas de células vegetales de tamaño similar no se han incrementado (Desikan *et al.*, 1996; Tenhaken y Rubel, 1998).

Las especies vegetales que contienen genes de la familia *Rboh* tienen homología con gp91^{phox}. En el genoma de *Arabidopsis* se han encontrado 10 genes que codifican para *Atrboh* (Torres *et al.*, 1998; Dangl y Jones, 2001). Todos los genes *Rboh* de células vegetales tienen una extensión en el extremo amino terminal presumiblemente citosólica de aproximadamente 300 aminoácidos con dos sitios de unión a Ca²⁺ (EF-hands) (Keller *et al.*, 1998), lo que puede indicar la regulación directa por Ca²⁺ en estas oxidasas. Esto es relevante en varios contextos funcionales en los cuales la señalización por Ca²⁺ precede a la producción de ERO. Este dominio está ausente en la subunidad gp91^{phox} de células de mamíferos, pero está presente en otros homólogos de la NADPH oxidasa, por ejemplo en la NADPH oxidasa 5 (NOX5) de mamíferos, la cual contiene cuatro sitios de unión a calcio en su extremo amino terminal y presenta una producción de superóxido dependiente de calcio (Banfi *et al.*, 2001). En contraste a la subunidad gp91^{phox} de mamíferos, las proteínas *Rboh* pueden producir superóxido en ausencia de componentes citosólicos adicionales y son estimuladas directamente por calcio (Sagi y Fluhr, 2001). Así, una NADPH oxidasa generadora de superóxido existe en plantas, aunque la estructura precisa de la subunidad y la regulación de su actividad difieren a la de fagocitos de mamíferos.

2.4.5 La NADPH oxidasa en interacciones bióticas

Inicialmente, se propuso que las ERO orquestaban el establecimiento de la respuesta de defensa en plantas y la muerte celular hipersensible que acompaña frecuentemente al reconocimiento satisfactorio de un patógeno (Levine *et al.*, 1994; Apóstol *et al.*, 1989). Varios grupos han reportado que los genes *Rboh* son sobrerregulados transcripcionalmente por patógenos o elicitores fúngicos (Desikan *et al.*, 1998; Yoshioka *et al.*, 2001; Simon-Plas *et al.*, 2002). Pruebas genéticas de la función de *Rboh* en la patogénesis inducida por la explosión oxidativa provienen del análisis de mutantes y líneas antisentido de *Rboh*. La infección de mutantes de *Arabidopsis* en

las cuales *AtrbohD* y *AtrbohF* son no funcionales demostró que *AtrbohD* es responsable de casi todas las ERO producidas en respuesta a patógenos bacteriales u oomicetos, mientras que *AtrbohF* es importante en la regulación de la HR (Torres *et al.*, 2002).

Las interacciones con otros reguladores de defensa en plantas pueden resultar en acciones divergentes de señalización por ERO dependientes de NADPH. Por ejemplo, las ERO aplicadas exógenamente pueden actuar de manera sinérgica en una curva de amplificación de señales con ácido salicílico para llevar a la HR (Draper, 1997; Shirasu *et al.*, 1997). De la misma manera, niveles coordinados de ERO y óxido nítrico (NO) son necesarios para producir HR (Delledone *et al.*, 2001), y ambos pueden mediar en el cierre de estomas mediado por ácido abscísico (Desikan *et al.*, 2003).

La combinación de isoformas específicas de Rac con isoformas específicas de Rboh puede tener efectos regulatorios diferenciales. Por ejemplo, *Osrac1* es un regulador positivo de la producción de ERO y muerte celular (Ono *et al.*, 2001), mientras que *Ntrac5* actúa como un regulador negativo de la producción de ERO dependiente de *NtrbohD* después de la elicitación con criptogeína (Morel *et al.*, 2004).

2.4.6 La Rboh-NADPH oxidasa en estrés abiótico y desarrollo

Las ERO generadas por Rboh-NADPH oxidasas de células vegetales también regulan las respuestas a estrés abiótico y desarrollo. Las ERO funcionan como intermediarios en la señalización por ácido abscísico (ABA) durante el cierre de estomas (Zhang *et al.*, 2001). Éste es un mecanismo para evitar la pérdida de agua en situaciones de déficit hídrico. El H₂O₂ induce la activación de canales de calcio y media el incremento en las concentraciones citosólicas de calcio en células guarda intactas (Pei *et al.*, 2000). Además, *AtrbohC* regula la expansión celular durante la formación de pelos radiculares. El análisis de la mutante defectuosa en *atrbohC* reveló que las ERO producidas por *AtrbohC* activan la hiperpolarización de los canales de calcio que son responsables de la expansión celular localizada durante la formación de pelos radiculares (Foreman *et al.*, 2003). De esta manera, las ERO generadas vía una NADPH oxidasa y la activación de canales de calcio puede representar un eslabón de señalización común a muchas respuestas de plantas, la explosión oxidativa también ha sido implicada en la activación del flujo de calcio (Levine *et al.*, 1996). Por lo tanto, los flujos de calcio parecen activar la producción de ERO tanto cuesta arriba como cuesta abajo, indicando una completa regulación espacio-temporal por calcio de estas rutas de señalización.

La fosforilación también puede jugar un papel importante en ambas funciones, cuesta arriba y cuesta abajo de Rboh. Yoshioka *et al.* (2003) reportó que la muerte celular inducida por MAPK pudo estar mediada por ERO producidas por *NtrbohB*, y que la misma cascada de MAPK actúa

incrementando los niveles de Nbrboh. Particularmente relevante en esta consideración es la identificación de una señal oxidativa inducible 1 (OXI1)/AGC2-1 (AGC2-1 por proteína relacionada a cAMP dependiente y cGMP dependiente de proteínas cinasas y proteína cinasa C 2-1), una cinasa involucrada en la señalización de fosfolípidos que es sobrerregulada por estímulos que producen ERO (Anthony *et al.*, 2004; Rentel *et al.*, 2004).

2.4.7 Defensas contra el estrés oxidativo

Las ERO causan oxidación de proteínas, daño al DNA y peroxidación de lípidos. La oxidación de proteínas ocurre a través de múltiples reacciones, incluyendo alteraciones en la cadena lateral e interrupción de la estructura proteica causando desnaturalización, agregación y susceptibilidad a la degradación (Dean *et al.*, 1997). El estrés oxidativo incrementa la frecuencia de mutaciones y la recombinación ilegítima en bacterias fotosintéticas púrpura (Ouchane *et al.*, 1997). La peroxidación de lípidos afecta a la membrana. De esta manera, la extrema reactividad de las ERO puede dañar todas las estructuras de la célula, para protegerse contra este daño, las plantas cuentan con enzimas y pequeñas moléculas antioxidantes en todos los compartimentos subcelulares.

2.4.8 Desintoxicación enzimática

La enzima superóxido dismutasa (SOD) convierte al radical superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual subsecuentemente puede ser eliminado. Las dos principales enzimas que sustraen al peróxido de hidrógeno son la catalasa (CAT) y la ascorbato peroxidasa (APX), ambas enzimas remueven H₂O₂, pero catalizan esta reacción de manera diferente y se localizan en diferentes compartimentos subcelulares. La catalasa se encuentra principalmente en peroxisomas, mientras que la APX se localiza en cloroplastos y en el citosol, lo que indica que sus funciones no se superponen. Además, gran parte del control del estrés oxidativo en la célula vegetal proviene de grandes cantidades de pequeñas moléculas oxidantes, tales como el ácido ascórbico (vitamina C), glutatión (Noctor y Foyer, 1998), alfa tocoferol (vitamina E) y carotenoides.

2.4.9 Entrecruzamiento de proteínas de la pared celular

Una de las defensas en las que el H₂O₂ actúa como intermediario es el entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular, lo que causa endurecimiento de la misma y de esta manera se puede limitar el ingreso del patógeno. En cultivos de células de soya tratadas con elicitores fúngicos, una proteína de pared celular rica en glicina con repeticiones simples (Val- Tyr-Lys-Pro-Pro) desaparece de la fracción extraíble con SDS en geles de poliacrilamida, pero sigue siendo detectable por inmunofluorescencia *in situ* (Bradley *et al.*, 1992). Esta actividad puede ser estimulada por H₂O₂ y puede ser bloqueada por la adición de la catalasa o el ascorbato.

2.4.10 Desencadenamiento de la muerte celular programada

Las ERO provenientes de la explosión oxidativa desencadenan la muerte celular programada (MCP) en la vecindad inmediata al sitio de infección y disparan la expresión de genes en una amplia área; en cultivos de células en suspensión de soya, la muerte celular fue inducida a concentraciones de 6 a 8 mM de H₂O₂ exógeno y la expresión de glutatión S-transferasa (GST) pudo ser inducida a concentraciones de 1 a 2 mM del mismo (Levine *et al.*, 1994), lo que indica que las ERO pueden actuar como señalizadoras de largo alcance. Además, el H₂O₂ actúa de manera sinérgica con NO en la inducción de la muerte celular (Delledone *et al.*, 1998). No está claro si esta MCP es desencadenada por la abrumadora inducción de las defensas antioxidantes de la célula o por la activación de un programa genético específico; tanto el H₂O₂ como el NO son causantes de estrés oxidativo. Se ha insinuado que un breve pulso de H₂O₂ es todo lo que se requiere para desencadenar la muerte celular y los pulsos adicionales no potencian esta respuesta (Levine *et al.*, 1994).

2.4.11 Relación con la resistencia sistémica adquirida

La formación de H₂O₂ en el epicentro de la infección induce la expresión de genes en el área circundante y en los tejidos distales, tales como las hojas no infectadas dentro de la misma planta. Las hojas distales serán subsecuentemente resistentes al ataque de patógenos, a este proceso se le conoce como respuesta sistémica adquirida (SAR). La inducción de SAR puede actuar en reiteración a la inducción de la expresión de genes en los tejidos circundantes a la infección. De hecho, la presencia de HR induce micro explosiones oxidativas y muerte celular en tejidos distales cuando se induce la expresión de genes sistémicos (Álvarez *et al.*, 1998). Este fenómeno también puede ser desencadenado por infiltración de sistemas generadores de H₂O₂.

La SAR también requiere de señalización por ácido salicílico (SA) (Gaffney *et al.*, 1993). El SA actúa potenciando la respuesta de HR hacia patógenos: la aplicación de concentraciones fisiológicas de SA a cultivos de células de soya no induce la producción de H₂O₂, pero cuando se añade además el patógeno, la explosión oxidativa alcanza un máximo mucho más rápidamente (Shirasu *et al.*, 1997).

2.4.12 Señalización por MAP cinasas

Aunque el mecanismo exacto de percepción del estrés oxidativo no se conoce, esta señal es traducida en la transcripción de genes y otras respuestas celulares por la señalización a través de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Este mecanismo involucra una cascada de fosforilación de proteínas iniciando con la activación cuesta arriba de proteínas cinasas y está involucrada en la respuesta de las plantas al estrés abiótico, patógenos y hormonas vegetales (Jonak *et al.*, 1999). La activación cuesta arriba de proteínas cinasas NPK (*Nicotiana* protein

kinase) de tabaco y ANP (proteína cinasa tipo NPK de *Arabidopsis*) puede ser inducida por estrés, expresión de MAPK y expresión genética (Kovtun *et al.*, 2000). La actividad de ANP puede ser especialmente inducida por tratamiento con H₂O₂.

2.5 Esfingolípidos membranales

Las bases de cadena larga (o esfingoideas) son la unidad estructural característica de los esfingolípidos. Son aminas alifáticas de cadena larga que contienen dos o tres grupos hidroxilo y con frecuencia un doble enlace *trans* en el carbono 4; es decir, son 2-amino-1,3-dihidroxi-alcanos o alquenos con estequiometría eritro-(2*S*,3*R*) con algunas otras modificaciones estructurales.

Las bases más comunes en los tejidos animales son la esfingosina, 4-esfingenina o (2*S*,3*R*,4*E*)-2-amino-4-octadecen-1,3-diol, junto con su análogo saturado dihidroesfingosina o esfinganina. Una base de cadena larga de origen vegetal común es la fitoesfingosina, 4*D*-hidroxi-esfinganina o (2*S*,3*R*,4*R*)-2-amino-octadecanotriol, aunque sus análogos insaturados, por ejemplo con un doble enlace *trans* en la posición 8, es decir la dihidrofitoesfingosina o 4*D*-hidroxi-8-esfingenina tienden a ser mucho más abundantes.

Las bases esfingoideas son peculiares entre otras especies de lípidos, ya que poseen una pequeña carga positiva a pH neutro como consecuencia de un enlace de hidrógeno intramolecular, lo que les permite atravesar las membranas o moverse entre ellas con relativa facilidad.

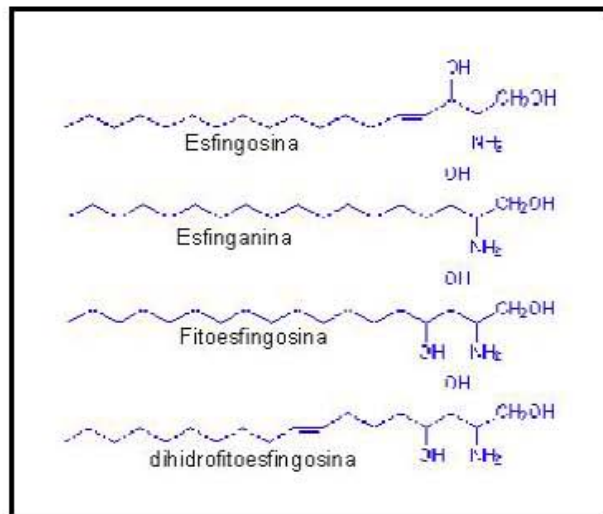


Figura 6. Estructura de algunas de las bases esfingoideas más abundantes en los tejidos animales y vegetales.

La esfingosina es una base esfingoidea de cadena larga que forma a la esfingomielina, los cerebrósidos, sulfátidos, gangliósidos y otros esfingolípidos. Se piensa que los esfingolípidos

están involucrados en la regulación del crecimiento celular, diferenciación y transformación neoplásica a través de la participación en la comunicación célula-célula y las interacciones célula sustrato y posibles interacciones con receptores celulares y sistemas de señalización (Hakomori, 1990).

Las ceramidas se forman a partir de una base esfingoidea unida a un ácido graso vía un enlace amida. Raramente se encuentran como tales dentro de los tejidos a niveles mayores que trazas, aunque pueden ejercer importantes efectos biológicos. Las ceramidas se forman como intermediarios clave en la biosíntesis de los esfingolípidos complejos, en los cuales un grupo hidroxilo primario terminal se une a un carbohidrato, fosfato, etc. Se sabe que las ceramidas juegan un papel importante en la señalización celular (Gómez-Muñoz, 1998; Perry y Hannun, 1998; Hannun y Obeid, 2002) y especialmente en la regulación de la apoptosis (Hartfield *et al.*, 1997) y diferenciación celular. De hecho, se ha sugerido que se forman en las células eucariotas bajo condiciones de estrés.

La ruta biosintética de la esfinganina involucra la condensación de la palmitoil-Coenzima A con serina, catalizada por la *serina palmitoiltransferasa* (SPT) para formar 3-ceto-esfinganina, el grupo ceto es entonces reducido a hidroxilo por una *reductasa* específica. La esfinganina libre es acilada rápidamente para formar dihidroceramida por una *dihidroceramida sintasa* o *esfinganina N-aciltransferasa*, la cual puede utilizar una amplia variedad de acil-CoAs. La inserción del doble enlace *trans* en posición 4 para producir esfingosina sucede sólo después de que la esfinganina ha sido esterificada de esta forma para formar una ceramida. En contraste, la fitoesfingosina se forma por la hidroxilación de la esfinganina libre en la posición 4. La biosíntesis *de novo* de las bases esfingoideas resulta ser esencial para la mayoría de los organismos. La inhibición de esta vía afecta el crecimiento y la viabilidad. Por ejemplo, las fumonisinas, que son toxinas fúngicas relacionadas estructuralmente con las bases esfingoideas, pueden causar un gran número de enfermedades tanto en humanos como animales por inhibición de la *ceramida sintasa*, lo que da lugar a la acumulación de esfinganina.

Aunque las bases esfingoideas libres raramente se encuentran a niveles mayores que trazas (típicamente de 1 a 10 nmoles/gramo de tejido húmedo), tienen importantes funciones como mediadores de eventos celulares, por ejemplo, inhiben a la proteína cinasa C indirectamente por un mecanismo que involucra la inhibición de la síntesis de los diacilgliceroles. Adicionalmente, se sabe que las bases esfingoideas son potentes inhibidores del crecimiento celular, aunque también estimulan la proliferación celular y síntesis de DNA (Sperling y Heinz, 2003; Lynch y Dunn, 2004).

2.6 Fumonisin

Entre los principales patógenos del maíz se encuentran especies del género *Fusarium*, los cuales son hongos comunes en los suelos de todo el mundo (Soriano y Dragacci, 2004) y están comúnmente asociados con maíz y otros cereales. El ciclo de enfermedad de las plantas atacadas por estos hongos presenta varias posibles rutas de infección (Munkvold y Desjardins, 1997):

1. Infección desde la semilla a la mazorca y al grano a través del movimiento sistémico en el tallo.
2. Infección desde la raíz al grano a través del tallo y la mazorca.
3. Infección a través de aire y agua contaminada con conidias a la espiga y el grano.
4. Infección a través de heridas causadas por insectos que pueden actuar también como vectores del inóculo.

El número de mohos presentes en las semillas no está relacionado directamente con la cantidad de toxina que puede ser detectada en una muestra (Cortez-Rocha *et al.*, 2003).

Las fumonisin (FB) son metabolitos secundarios de estas especies y las principales micotoxinas sintetizadas por las mismas. Se han encontrado varios análogos de las fumonisin, sin embargo, sólo la fumonisin B₁ (FB₁) y en menor grado la FB₂, se han encontrado de manera natural en niveles significativos en maíz y productos derivados de este cereal (Soriano y Dragacci, 2004), estimándose que aproximadamente el 59% de estos productos alrededor del mundo están contaminados con cantidades variables de FB₁ (Desai *et al.*, 2002).

Las fumonisin muestran diferentes efectos toxicológicos en animales y humanos, se han asociado con leucoencefalomalacia equina (Kellerman *et al.*, 1990; Marasas *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1992), edema pulmonar porcino (Harrison *et al.*, 1990; Haschek *et al.*, 1992; Haschek *et al.*, 2001), nefrotoxicidad y cáncer de hígado en ratas (Gelderblom *et al.*, 1991; Voss *et al.*, 2001), efectos aterogénicos en monos (Fincham *et al.*, 1992), hipertrofia medial de arterias pulmonares en cerdos (Castel *et al.*, 1994), inmunosupresión en aves de corral (Li *et al.*, 1999) y hemorragia cerebral en conejos (Buchi *et al.*, 1996). Además, la presencia de FB₁ en maíz cultivado en las regiones de Traskan en África, se ha asociado estadísticamente con el alto índice de cáncer esofageal en humanos (Marasas *et al.*, 1988; Rheeder *et al.*, 1992; Sydenham *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1992), así como en el norte de Italia (Franceschi *et al.*, 1990), Irán (Shephard *et al.*, 2000) y el sudeste de los Estados Unidos (Gelderblom *et al.*, 1992; Rheeder *et al.*, 1992) y con la promoción de cáncer primario de hígado en ciertas áreas endémicas de la República Popular China (Chu y Li, 1994; Groves *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001). De acuerdo a la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer, a las fumonisin se les clasifica como carcinógenos clase 2B. Además, estos compuestos han sido implicados en enfermedades

epidémicas causadas por alimentos contaminados caracterizadas por dolor abdominal, diarrea, etc., en algunas villas de la India debidas al consumo de sorgo y maíz contaminados (Bath *et al.*, 1997).

La FB₁ (figura 7) tiene la estructura 2S-amino-12S,16R-dimetil-3S,5R,10R,14S,15R-penta-hidroxi-eicosano con los grupos hidroxilo de los carbonos 14 y 15 esterificados a un grupo carboxilo terminal del ácido propano-1,2,3-tricarboxílico (TCA) (Bolger *et al.*, 2001). El grupo amino libre parece jugar un papel específico en la actividad biológica de la FB₁. La forma hidrolizada de la FB₁ es el aminopentol (AP1).

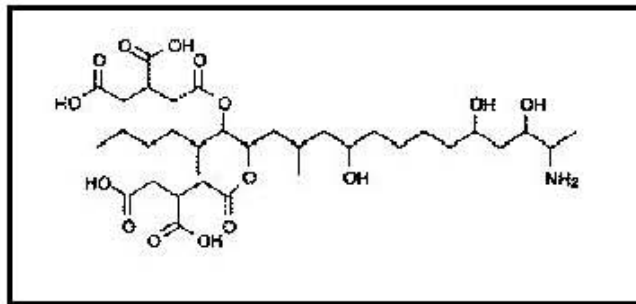


Figura 7. Estructura de la FB₁

La FB₁ afecta las células vía la inhibición de la ceramida sintasa (esfingosina *N*-aciltransferasa), una enzima clave en la biosíntesis *de novo* y reorganización de los esfingolípidos. Esta inhibición toma lugar debido a las marcadas similitudes entre las estructuras moleculares de la FB₁ y los esqueletos de las bases de cadena larga (esfingoideas) de los esfingolípidos (Wang *et al.*, 1990; Merrill *et al.*, 2001). En el modelo común, el esqueleto de aminopentol compite con un sustrato (base esfingoidea), mientras que los ácidos tricarbálicos interfieren con el enlace del ácido graso de la acil- CoA. Tres líneas de evidencia sostienen este modelo: (1) La potencia con la cual la FB₁ inhibe a la sintasa de ceramida es sensible a las concentraciones de la base esfingoidea y del ácido graso acil-CoA (Merrill *et al.*, 1993); (2) La remoción de ácidos tricarbálicos disminuye la potencia de la inhibición de la sintasa de ceramida (Humpf *et al.*, 1998); y (3) Después de la remoción de los ácidos tricarbálicos, se convierte no sólo en inhibidor, sino también en sustrato para la acilación por ceramida sintasa (Humpf *et al.*, 1998).

La inhibición de la síntesis de ceramida inducida por FB₁ puede dar como resultado un amplio espectro de cambios en el metabolismo de lípidos y las rutas de señalización dependientes de ellos. Ésta parece ser la mayor contribución a la carcinogénesis y otros efectos deletéreos de la FB₁ (Stockmann-Juvala *et al.*, 2004).

3. ANTECEDENTES INMEDIATOS

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio con fumonisina B₁ (FB₁) se ha observado que embriones de maíz que han sido embebidos en esta toxina durante 24 h tienen una mayor liberación de solutos en agua desionizada que los embriones que han sido embebidos sin la toxina, lo cual sugiere que la toxina altera la permeabilidad de las membranas celulares de estos embriones (Gutiérrez *et al.*, 1999) y su fluidez (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2000), consistentes con el surgimiento de una explosión oxidativa, una de las reacciones iniciales de resistencia ante el ataque de patógenos. En apoyo a esta sugerencia se ha encontrado que la FB₁ desencadena otras respuestas de defensa como el aumento en la síntesis de RNA_m de proteínas de defensa (SanJuan, 2001), el aumento en la degradación de DNA o apoptosis (De la Torre *et al.* 2003) y el incremento en la producción de ácido salicílico (Rivas *et al.*, 2003).

4. HIPÓTESIS

La adición *in vivo* de FB₁ y compuestos esfingoideos a embriones de maíz modifica la actividad de la NADPH oxidasa.

La modificación de la actividad de la NADPH oxidasa está relacionada con las otras respuestas de defensa previamente observadas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la presencia de un homólogo de la subunidad catalítica de la NADPH oxidasa de neutrófilos (NOX2) en fracciones membranales de embriones de maíz (*Zea mays* L.), medir su actividad y determinar cómo es afectada por la adición de compuestos esfingoideos.

5.2 Objetivos específicos

1. Establecer los métodos para medir actividad de NADPH oxidasa en fracciones membranales totales (microsomas) y de membrana plasmática de embriones de maíz, tanto en gel como en disolución.
2. Aplicar los compuestos esfingoideos FB₁, SN y PS *in vivo* a embriones de maíz y determinar concentraciones y tiempos óptimos de aplicación.
3. Medir actividad de NADPH oxidasa en microsomas y en fracciones de membranas plasmáticas de los embriones expuestos a los compuestos esfingoideos.
4. Encontrar una secuencia de aminoácidos conservada dentro de los homólogos de NADPH oxidasa en células vegetales para la cual se obtengan anticuerpos contra la enzima y poder detectarla en fracciones membranales de embriones de maíz.

Material biológico

Se utilizaron embriones de maíz (*Zea mays* L.) de la raza criolla Chalqueño (cosecha 2003), disectados a partir de semillas secas, los cuales fueron almacenados a 4 °C hasta el momento de ser utilizados.

Métodos

6.1 Imbibición de embriones

6.1.1 Control

Los embriones de maíz fueron desinfectados utilizando una disolución de hipoclorito de sodio que fue preparada a partir de una disolución comercial con un contenido de 6% de cloro activo y diluída 1:10 (v:v) en agua desionizada. Los embriones de maíz se sumergieron en 20 ml de esta disolución y se mantuvieron en agitación durante 2 min; posteriormente se decantó el líquido y los embriones se lavaron tres veces más con agua desionizada estéril.

Los embriones así desinfectados fueron embebidos en cajas de petri estériles las cuales contenían medio de cultivo a base de agarosa 1% disuelta en amortiguador de imbibición (50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 50 mM Tris, pH 7.6) y diluído en agua desionizada en una proporción 1:2 (v:v); el volumen final de medio dependió del tamaño de la caja de petri: 20 ml para cajas de 9 cm de diámetro, embebiéndose 3 g de embriones por caja y 35 ml para cajas de 14 cm de diámetro, en cada una de las cuales se embebieron 10 g de embriones. Posteriormente, los embriones fueron incubados a 29°C en oscuridad durante 3, 6, 12, 22 ó 24 h dependiendo del experimento. Los ensayos con embriones sin germinar consistieron en incubar a los mismos durante el tiempo deseado en el mismo medio; mientras que en los ensayos con embriones germinados éstos fueron incubados durante 22 h en medio control y posteriormente se transfirieron a otros medios durante 3, 6 ó 12 h adicionales. Al término de la incubación los embriones fueron congelados en N₂ líquido y guardados en bolsas de polietileno a -70°C hasta su uso. La desinfección e imbibición de los embriones se llevó a cabo en condiciones estériles en la campana de flujo laminar. Las cajas de petri y el medio de cultivo fueron esterilizados a 120°C y 15 psi durante 20 min.

6.1.2 En presencia de compuestos esfingoideos

Se prepararon los medios de cultivo y se esterilizaron en las mismas condiciones que el control, cuando la temperatura del medio descendió a aproximadamente 40°C, se añadieron los volúmenes necesarios de FB₁ (1 mM disuelta en agua), SN (1 mM disuelta en etanol) o PS (1 mM disuelta en etanol), para tener concentraciones finales de 10 ó 20 µM del compuesto. El contenido de cada matraz se agitó y virtió en cajas de petri estériles.

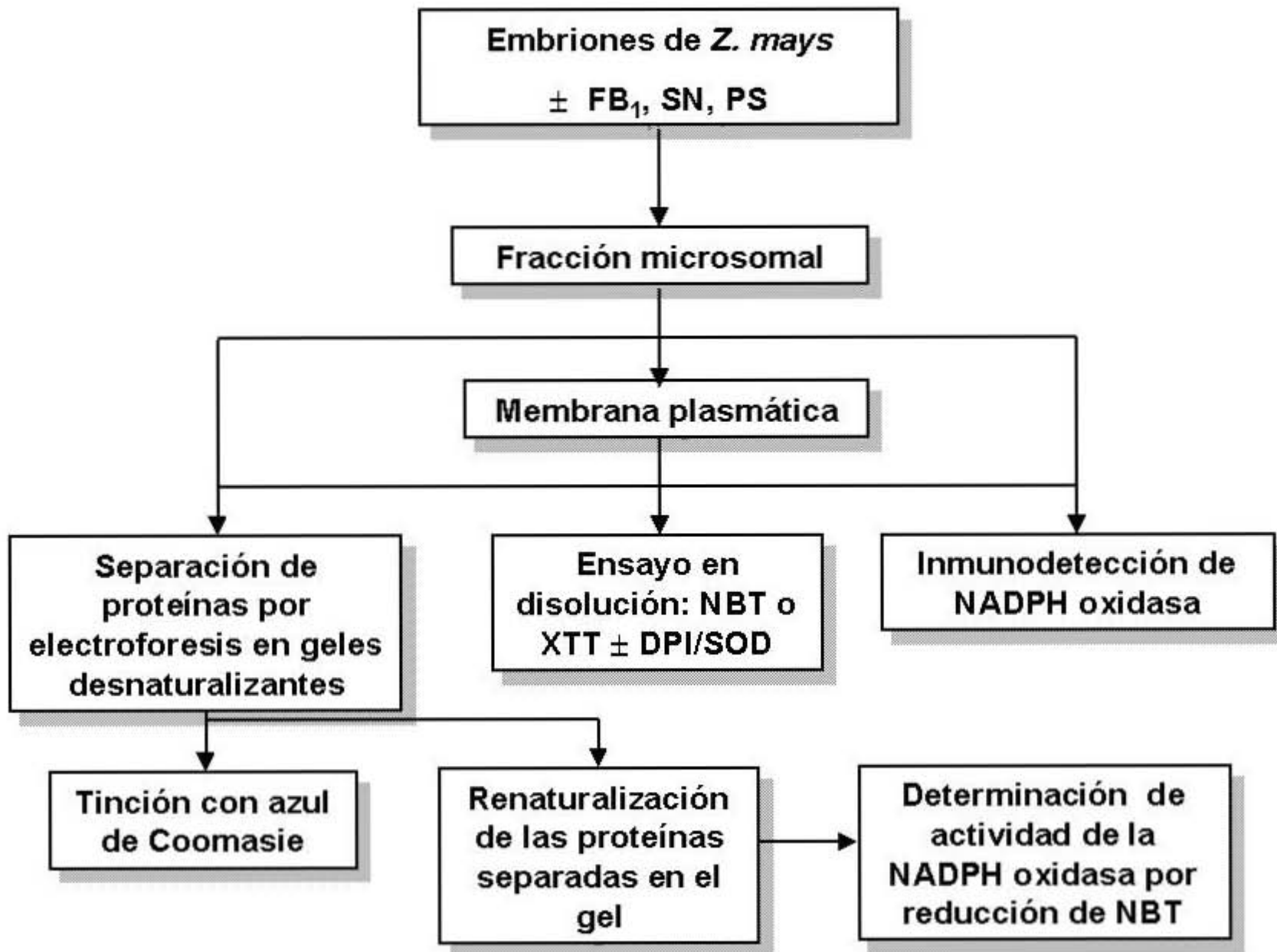


Figura 8 Estrategia experimental seguida para determinar la actividad de la NADPH oxidasa en embriones de maíz.

Los embriones previamente desinfectados con hipoclorito de sodio se distribuyeron en estas cajas y se incubaron a 29°C durante 3, 6, 12 ó 24 h o fueron transferidos a cajas con estos medios durante 3, 6 ó 12 h después de haber sido incubados en medio control por 22 h para la realización de los experimentos con embriones germinados.

6.2 Obtención de las fracciones membranales de embriones de maíz

De los embriones embebidos se obtuvieron fracciones microsomales y de membrana plasmática por la técnica de reparto de fases en dos polímeros acuosos (Larsson *et al.*, 1994; Sánchez-Nieto *et al.*, 1997).

6.2.1 Obtención de la fracción microsomal

Los embriones congelados se pesaron y molieron en presencia de amortiguador de homogeneización [250 mM sorbitol, 1 mM EDTA, 1 mM KCl, 50 mM HEPES/BTP, pH 7.8, 5 mM DTT y 1.6 µg/ml cocktail de inhibidores de proteasas (Roche, NJ); el DTT y el cocktail de inhibidores de proteasas se adicionaron al momento de utilizar el amortiguador] en una relación 1:2 (p:v). El homogenado obtenido de esta forma se filtró a través de 4 capas de gasa previamente humedecida con agua desionizada y se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 min a 4°C. Después de centrifugar, los tubos se colocaron en baño de hielo y con ayuda de una espátula se retiró la capa de grasa que quedó en la parte superior; el sobrenadante se transfirió a otro tubo con ayuda de una pipeta Pasteur y se centrifugó nuevamente a 11 000 rpm durante 10 min a 4°C. Nuevamente se tomó el sobrenadante y se centrifugó, ahora a 45 000 rpm durante 75 min a 4°C, después de lo cual se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y el botón obtenido se resuspendió con la ayuda de un pincel en un volumen pequeño de amortiguador de ajuste de peso (620 mM Sorbitol, 5 mM KH₂PO₄, 5 mM KCl, 1mM DTT y 0.17 mM EDTA, pH 7.0; el DTT se adicionó al momento de utilizar el amortiguador). Se midió el volumen obtenido y se adicionó cocktail de inhibidores para una concentración final de 1.6 µg/ml. Se determinó la cantidad de proteína presente en la muestra por el método de Lowry modificado por Peterson (1977) y se guardó a -70°C hasta su uso.

6.2.2 Obtención de vesículas de membrana plasmática

Para obtener las fracciones de membrana plasmática se adicionaron 80 mg de proteína microsomal a una mezcla de fases (ver composición en la tabla 1) de 24 g de peso. Se agregó amortiguador de ajuste peso (620 mM sorbitol, 5 mM KH₂PO₄, 5 mM KCl, 1 mM DTT y 0.17 mM EDTA, pH 7.0) hasta que el peso final de la mezcla fue de 32 g. Los tubos se sellaron con película flexible parafilm, se agitaron cuidadosamente por inversión 30 veces y se centrifugaron a 4 000 rpm durante 15 min a 4°C. Después de centrifugar, se recuperó la fase superior (fase U1, de “upper phase 1st partition”), se adicionó a la fase de dextrán (DEX, fase inferior) previamente

pesada de un sistema de fases (ver composición en la tabla 1) con peso final de 32 g y se ajustó el peso del sistema (DEX + U1) a 32 g con la fase superior (PEG) previamente extraída del sistema de fases y mantenida a 4°C. Nuevamente se centrifugó a 4 000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó la fase superior del centrifugado diluyéndose en un volumen igual de amortiguador de lavado (350 mM sorbitol, 2 mM HEPES, 1 mM KCl, 1 mM DTT, 1.6 µg/ml cocktail de inhibidores, el pH se ajustó a 7.6 con MES; el DTT y el cocktail de inhibidores de proteasas se adicionaron al momento de utilizar el amortiguador). Se centrifugó a 45 000 rpm durante 75 min a 4°C, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y el botón obtenido se resuspendió con la ayuda de un pincel en un volumen pequeño de amortiguador de lavado, se midió el volumen resultante y se adicionó cocktail de inhibidores para una concentración final de 1.6 µg/ml. La cantidad de proteínas presentes fue determinada por el método de Lowry modificado por Peterson (1977). Las vesículas de membrana plasmática así obtenidas fueron guardadas a -70°C hasta su uso.

Tabla 1. Composición de las mezclas y sistemas de fases para la obtención de vesículas de membrana plasmática.

Componentes	Mezcla de fases (24 g)	Sistema de fases (32 g)	Concentración final
20% (p/v) Dextran T500 (DEX)	10.4 g	10.4 g	6.7%
40% (p/v) Polietilenglicol (PEG)	5.2 g	5.2 g	6.7%
Sorbitol (reactivo analítico)	2.712 g	3.6152 g	620 mM
200 mM KH ₂ PO ₄	600 µl	800 µl	5 mM
50 mM KCl	2400 µl	3200 µl	5 mM
300 mM DTT disuelto en 50 mM EDTA, pH 7.0	80 µl	112 µl	1 mM
H ₂ O c.b.p.	24 g	32 g	---
Proteína microsomal	80 mg	---	
Amortiguador de ajuste de peso c.b.p.	32 g	---	---

6.3 Determinación de proteína

Se utilizó la técnica de Lowry modificada por Peterson (1977), en la cual las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin Ciocalteu para dar un complejo coloreado. El color que se forma se debe a la reacción del cobre con la proteína. La intensidad de color depende de los aminoácidos aromáticos presentes, en especial la tirosina y el triptofano.

Se tomaron 0.9 ml de agua desionizada y se adicionaron 2 µl de la muestra a cuantificar, más 0.1 ml de 0.15% (p:v) desoxicolato de sodio (NaDOC); 1.0 ml del reactivo A preparado a partir de una mezcla de volúmenes iguales de agua, 0.8 N NaOH, 10% (p:v) SDS y disolución

CTC [10% (p:v) Na₂CO₃, 0.1% (p:v) CuSO₄, 0.2% (p:v) tartrato de potasio: K₂C₄H₄O₆] y 0.1 ml del reactivo de Folin Ciocalteau 16.7% (v:v) disuelto en agua desionizada. Los tubos fueron agitados después de la adición de cada componente y mantenidos en reposo durante 30 min a temperatura ambiente, después de lo cual se leyó la absorbancia a $\lambda_{750 \text{ nm}}$. La concentración de proteína se calculó a partir de una curva estándar en la cual la muestra a cuantificar fue sustituida por 10, 20, 30, 40 ó 50 μl de una disolución de concentración 1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), ajustándose el volumen de agua a 0.9 ml.

6.4 Medición de actividad de NADPH oxidasa en disolución

La formación del radical superóxido catalizada por fracciones membranales de embriones de maíz fue determinada en disolución empleando colorantes de tetrazolio, los cuales, al ser reducidos por este radical, dan lugar a la formación de un producto colorido (formazán) que puede ser detectado espectrofotométricamente. Los colorantes empleados fueron: NBT [nitroazul de tetrazolio; cloruro de 2,2'-bis(4-nitrofenil)-5,5'-difeníl-3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-difeníl)enoditrazolio] y XTT [2,3-Bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida de sodio], de acuerdo con las técnicas reportadas en Able *et al.*, (1998) y Sutherland y Learmonth (1997) respectivamente. La reacción fue iniciada por la adición de las proteínas membranales a la mezcla de los otros componentes, la reducción de los colorantes se determinó a 20 min de iniciada.

6.4.1 Reducción de NBT y XTT

El ensayo se realizó adicionando 30 μg de proteínas de membrana (de fracción microsomal o de membrana plasmática) a una celda que contenía amortiguador de actividad (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM CaCl₂, 0.2 mM NADPH y 0.2 mM de NBT o XTT) para un volumen final de 800 μl , determinándose la absorbancia 20 min después de iniciada la reacción a $\lambda_{510\text{nm}}$ cuando el colorante empleado fue NBT y $\lambda_{470\text{nm}}$ en el caso de XTT.

6.4.2 Uso de inhibidores

Previo a la determinación de actividad en disolución, las fracciones membranales fueron incubadas durante 15 min a temperatura ambiente con 50 μM DPI disuelto en DMSO o 100 ó 375 u/ml de SOD (superóxido dismutasa) de eritrocitos de bovino (una unidad inhibe 50% la velocidad de reducción del citocromo c en un sistema acoplado con xantina y xantina oxidasa a pH 7.8 y 25°C en un volumen de reacción de 3.0 ml). El DPI forma un aducto covalente con la flavina y de esta manera actúa como inhibidor de la NADPH oxidasa y en general de las enzimas que contienen flavina (O'Donnell *et al.*, 1993); la SOD cataliza la dismutación del radical $\cdot\text{O}_2^-$ a H₂O₂ y O₂ (McCord y Fridovich, 1969) por lo que se puede usar como inhibidor en la reacción de reducción de los colorantes de tetrazolio.

La contaminación por proteínas membranales de mitocondria capaces de producir radicales de oxígeno se evaluó preincubando las fracciones membranales durante los 15 minutos previos a la detección de actividad en presencia de rotenona (1 µg/ml disuelta en acetona) o NaN₃ (1 mM disuelta en agua) estos compuestos son inhibidores de las enzimas mitocondriales NADH deshidrogenasa y citocromo₄₅₀ respectivamente, y podrían catalizar la formación de radicales capaces de reducir a los colorantes de tetrazolio.

6.4.3 Efecto de FB₁ y SN añadidos *in vitro* a vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz en la reducción de NBT

Para evaluar el papel de la FB₁ y la SN añadidas *in vitro* en la reducción de NBT, las vesículas de membrana plasmática fueron incubadas durante 15 min a temperatura ambiente con 0.01 pmol de FB₁ o 0.1 pmol de SN, al cabo de este tiempo, se realizó el ensayo de reducción de NBT en las condiciones estándar.

6.5 Separación electroforética de proteínas

Las fracciones membranales fueron sometidas a una separación electroforética en un sistema de geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS (Schägger y von Jagow, 1987).

6.5.1 Preparación de los geles

Se prepararon geles de poliacrilamida con un grosor de 1.5 mm, la composición de los cuales se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de un gel de acrilamida según el procedimiento de Schägger y von Jagow (1987).

Componentes	Gel Separador	Gel concentrador
30% (p:v) acrilamida; 0.938% (p:v) Bisacrilamida	2200 µl	449.2 µl
Amortiguador del gel (0.3% (p:v) SDS y 3 M Tris HCl, pH 8.9)	2200 µl	842.2 µl
Glicerol	890 µl	---
H ₂ O	1336 µl	2076 µl
10% (p:v) persulfato de amonio*	22.2 µl	28 µl
TEMED*	2.2 µl	2.8 µl
Volumen total	6650.4 µl	3398.2 µl

* Adicionar justo antes de usarse

Para el ensayo de actividad se cargaron 100 µg de proteína en cada pozo del gel, mientras que para los controles de cargado y para las electrotransferencias se cargaron 25 µg de proteína en cada pozo; las muestras fueron incubadas con amortiguador de desnaturización [100 mM

Tris/HCl, pH 6.8, 10% (p:v) SDS, 4% (v:v) β -mercaptoetanol y 0.6% (p:v) azul de bromofenol], en una proporción 1:1.5 (v:v) proteína:amortiguador de desnaturalización por 30 min a 45°C, después de lo cual se sometieron a la separación electroforética. Como referencia se cargó un pozo con 10 μ l de una mezcla de proteínas de peso molecular conocido (estándares preteñidos de pesos moleculares BenchMark, No. de catálogo 10748-010, marca Invitrogen). Se corrió el gel a 60 V durante 30 min y después a 90 V durante 2 h o hasta que el indicador saliera del gel. Los amortiguadores de corrida fueron: amortiguador del cátodo [0.1 M Tris, 0.1 M Tricina y 0.1% (p:v) SDS, el pH resultante fue de 7.7], amortiguador del ánodo (0.2 M Tris/HCl, pH 8.9).

6.5.2 Tinción con azul de Coomasie

Después de la separación electroforética, los geles de los controles de cargado, se colocaron en 100 ml de disolución fijadora [50% (v:v) metanol, 10% (v:v) CH₃COOH] y se mantuvieron en agitación rotatoria suave a temperatura ambiente durante al menos 20 min. Se removió esta disolución y se sustituyó por disolución teñidora [39.5% (v:v) metanol, 21% (v:v) CH₃COOH y 0.158% (p:v) azul de Coomasie G250]. El gel se mantuvo en agitación rotatoria suave a temperatura ambiente durante un mínimo de 15 min. La destinción se llevó a cabo sustituyendo la disolución teñidora por una disolución que contenía 45.5% (v:v) de etanol y 9.1% (v:v) de CH₃COOH y colocando una esponja para que absorbiera el exceso de colorante. Finalmente, se mantuvo en agitación rotatoria suave hasta que las bandas de proteína fueron visibles y hubo poco fondo de tinción. Los geles se incubaron en una disolución 5% (v:v) de glicerol durante 24 h y posteriormente se colocaron entre una capa de papel filtro y una de celofán y se secaron en un secador de geles a 80°C durante tres horas.

6.6 Renaturalización de la NADPH oxidasa en gel y determinación de actividad

Los geles desnaturalizados fueron sometidos al ensayo de actividad descrito por Sagi y Fluhr (2001) hasta que las bandas de actividad fueron visibles, los pasos del proceso fueron:

6.6.1 Tratamiento previo a la separación electroforética

Las muestras conteniendo 100 μ g de proteína (el volumen de muestra agregado fue variable sin embargo, el volumen final se igualó en todos los casos por adición de amortiguador de lavado) se incubaron con el detergente zwitteriónico CHAPS {ácido 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfónico} a una concentración final de 0.5% en un volumen final de 15 μ l durante 45 min a 4°C. Posteriormente, las muestras se incubaron con amortiguador de desnaturalización [100 mM Tris/HCl, pH 6.8, 10% (p:v) SDS, 4% (v:v) β -mercaptoetanol y 0.6% (p:v) azul de bromofenol], en una proporción 1:1.5 (v:v) proteína:amortiguador de desnaturalización por 30 min a 45°C, después de lo cual se sometieron a la separación electroforética.

6.6.2 Lavado del gel para sustituir el SDS por Tritón X-100

El gel desnaturalizado se agitó durante 45 min en 500 ml de amortiguador de lavado [10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 2% (p:v) EDTA y 1 % (p:v) Tritón X-100], después de lo cual se sustituyó el amortiguador por 500 ml de amortiguador nuevo, repitiéndose el lavado durante 45 min más.

6.6.3 Renaturalización de la NADPH oxidasa en gel

Después del lavado para sustituir el SDS por Tritón X-100, el gel se incubó durante 45 min a temperatura ambiente y con agitación suave en 100 ml de amortiguador de regeneración (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 25 μM FAD y 7 mM β-mercaptoetanol).

6.6.4 Determinación de actividad de NADPH oxidasa por reducción de NBT en gel

La determinación de actividad se llevó a cabo incubando el gel en 20 ml de amortiguador de incubación (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.2 mM NBT y 0.2 mM NADPH) en oscuridad, con agitación suave a temperatura ambiente. La incubación se mantuvo hasta que las bandas de actividad fueron visibles (aproximadamente 24 h), la reacción fue detenida por inmersión del gel en agua.

6.6.5 Uso de inhibidores en el ensayo de actividad de NADPH oxidasa en gel

Durante la determinación de actividad, se adicionaron al amortiguador de incubación 50 μM DPI o 100 u/ml de SOD de eritrocitos de bovino. El DPI forma un aducto covalente con la flavina y de esta manera actúa como inhibidor de la NADPH oxidasa (O'Donnell *et al.*, 1993); la SOD cataliza la dismutación del radical ·O₂⁻ a H₂O₂ y O₂ (McCord y Fridovich, 1969) y de esta manera actúa como inhibidor en la reacción de reducción de NBT.

6.7 Electrotransferencia de proteínas de geles de poliacrilamida SDS a una membrana de PVDF

Se usó la técnica de inmunotransferencia o réplica en Western (Aebersold, 1986; Beisiegel, 1986; Matsudaira, 1987). Después de la separación electroforética de proteínas, el gel a transferir se mantuvo en agitación rotatoria suave durante 15 min en 100 ml de disolución amortiguadora de transferencia [25 mM Tris, 20% (v:v) metanol, 0.1% (p:v) SDS]. Posteriormente se ensambló el cassette de la siguiente forma: se colocó sobre la rejilla del cassette una esponja saturada con disolución amortiguadora de transferencia, sobre la cual se colocó una capa de papel filtro humedecido en la misma disolución, el gel se situó sobre el papel filtro y sobre el mismo se acomodó una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) del mismo tamaño que el gel y previamente humedecida en metanol y disolución amortiguadora de transferencia. Sobre la membrana de PVDF se colocó otra capa de papel filtro humedecido en disolución amortiguadora de transferencia; con objeto de eliminar las posibles burbujas de aire que podrían disminuir la eficiencia de la transferencia, se hizo rodar un tubo de ensaye a modo de rodillo sobre el papel

filtro y finalmente se colocó otra esponja saturada en la misma disolución amortiguadora de transferencia, se cerró el cassette, se introdujo en la cámara de electrotransferencia en la que previamente se había colocado un agitador magnético y se cubrió con suficiente disolución amortiguadora de transferencia. La transferencia se llevó a cabo durante 2 h a 25 V y temperatura ambiente, manteniendo agitación suave. Al término de la electrotransferencia se removió la membrana de PVDF y se colocó en 20 ml de TTBS [0.5 M NaCl, 0.05% (v:v) Tween 20 y 20 mM Tris/HCl, pH 7.5], cuidando que la cara que estuvo en contacto con el gel quedara hacia arriba, se mantuvo en agitación rotatoria suave durante 5 min a temperatura ambiente, se removió la disolución de TTBS y se lavó nuevamente con 20 ml de disolución TTBS nueva en las mismas condiciones. Se realizó un tercer lavado, esta vez utilizando 20 ml de disolución de TBS (0.5 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5), manteniéndose en agitación rotatoria suave durante 5 min a temperatura ambiente.

6.8 Inmunodetección de la NADPH oxidasa (técnica de réplica en Western)

Se realizó la saturación de los sitios inespecíficos o bloqueo de la membrana colocando la membrana de PVDF con las proteínas transferidas en 20 ml de una disolución al 5% (p:v) de leche descremada en polvo marca Svelty disuelta en TBS y se mantuvo en agitación rotatoria suave a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, se realizaron 2 lavados de 5 min cada uno en agitación rotatoria suave y a temperatura ambiente con 20 ml de TTBS y uno más con 20 ml de TBS. Para detectar a la NADPH oxidasa, la membrana de PVDF se incubó durante 16 h a 4°C en una disolución en la que se utilizó como primer anticuerpo un suero que reacciona contra un fragmento de la porción del carboxilo terminal de esta enzima para especies vegetales en una dilución 1:3000 (v:v), en una disolución que contenía 5% (p:v) de leche descremada en polvo (Svelty) disuelta en TBS. Al término de la incubación se realizaron nuevamente 2 lavados de 5 min cada uno con 20 ml de TTBS y un tercero con 20 ml de TBS. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti IgG (H+L)-AP de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (BIO-RAD) en una dilución 1:1000 en TBS y utilizando 5% (p:v) de leche descremada en polvo (Svelty), el cual se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en reposo. Nuevamente se realizaron dos lavados con 20 ml de TTBS y uno más con 20 ml de TBS durante 5 min cada uno. Las bandas de reacción del anticuerpo se revelaron con disolución para desarrollar color [0.03% (p:v) de NBT disuelto en 70% (v:v) DMF, 0.015% (p:v) de BCIP disuelto en DMF, 0.1 M NaHCO₃ y 1 mM MgCl₂ a pH 9.8]. Se mantuvo en agitación rotatoria suave hasta que las bandas de proteína fueron visibles. La reacción se detuvo por inmersión en agua desionizada. Las membranas se conservaron en agua en bolsas de polietileno, protegidas de la luz y a 4°C.

6.9 Obtención del anticuerpo contra un fragmento de la porción carboxilo terminal de la NADPH oxidasa de células vegetales

6.9.1 Búsqueda de una secuencia de aminoácidos conservada y antigénica dentro de las NADPH oxidasas de células vegetales

Se realizó la búsqueda de secuencias de aminoácidos para homólogos de NADPH oxidasa en las bases de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Swiss Prot (<http://au.expasy.org/sprot/>). Se encontraron 408 secuencias de aminoácidos correspondientes a varias especies, más un fragmento de una secuencia de nucleótidos de maíz putativa para esta enzima (<http://www.maizegdb.org/>). De las secuencias de aminoácidos se seleccionaron las 72 correspondientes a especies vegetales, más la secuencia correspondiente a la subunidad catalítica (gp 91^{phox} = NOX2) de la NADPH oxidasa de neutrófilos de humano (*Homo sapiens*). Se realizó el alineamiento de dichas secuencias con ayuda del programa Bioedit, versión 5.0.0 y se obtuvo el árbol filogenético para esas secuencias, de las cuales se seleccionaron 56 por ser no redundantes. Se realizó un nuevo alineamiento para estas secuencias y del dendrograma obtenido se seleccionaron 11 secuencias representativas, las cuales incluyeron a las secuencias reportadas como *rboh* (respiratory burst oxidative homolog) B (AAT35117), una proteína putativa de *rboh* E (XP_482730), una proteína putativa *rboh* (BAD73392) y un producto no nombrado de proteína (CAF33404) de *Oryza sativa*; *rboh* (BAB70751) de *Solanun tuberosum*; gp91phox (AAF73124) de *Lycopersicon esculentum*; NADPH oxidasa (AAM28891) y un producto no nombrado de proteína (CAF33405) de *Nicotiana tabacum*; *rboh* E (NP_173357) y *rboh* (BAB08369) de *Arabidopsis thaliana*, también se incluyó el fragmento de la secuencia de nucleótidos de maíz (48851) previamente traducido. A todas las secuencias seleccionadas se les determinaron las regiones antigénicas con ayuda de los algoritmos de Hopp/Woods, Parker y Welling, así como del programa Bioinformatics (The Molecular Immunology Foundation: <http://immunax.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html>). Se seleccionó un fragmento de 15 aminoácidos (CTSVYEEGDARSALI) localizado en la región del carboxilo terminal de la enzima, de acuerdo a los siguientes criterios: 1) ser una región muy conservada dentro de las secuencias consultadas; 2) los cuatro programas consultados coincidieron al señalarla como antigénica y 3) contar con una cisteína natural en un extremo, lo cual resultaba muy conveniente para hacer el conjugado a hemocianina de lamprea (Van Regenmortel *et al.*, 1988).

6.9.2 Obtención del anticuerpo

La síntesis del péptido y la haptización fueron realizadas por la compañía Neo MPS, Inc. (San Diego, California, EU). El procedimiento incluyó: la síntesis del péptido y la conjugación con hemocianina de lamprea. La obtención del suero inmune fue realizada con ayuda de la Q.B.P.

Miriam Vázquez Acevedo del laboratorio 325-Nte. del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El procedimiento seguido consistió en:

a) Inmunización del conejo. Se inyectó al conejo con 100 μg del antígeno mezclado con 1 ml de adyuvante completo (Sigma Chemicals, se resuspendió y agitó durante 20 min y se inyectó en muslo). Una semana después se aplicó un refuerzo en el cual se inyectaron 50 μg del antígeno mezclado con 1 ml de adyuvante incompleto (Sigma Chemicals). Posteriormente se aplicaron dos refuerzos similares más en intervalos de tres semanas.

b) Sangría de prueba. Se realizó una sangría al conejo al terminar la serie de inmunizaciones. El suero se obtuvo manteniendo la sangre en reposo durante 24 h a 4°C, y posteriormente centrifugando a 10 000 rpm durante 30 min. Con este suero se realizaron ensayos de réplica en Western, utilizando como antígenos a fracciones membranales de embriones de maíz y de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) para determinar la presencia de anticuerpos en el suero. Se detectaron bandas de proteína con una dilución del anticuerpo 1:3 000.

c) Obtención del suero inmune. Se realizó un cuarto refuerzo en el cual se inyectaron 50 μg del antígeno mezclado con 1 ml de adyuvante incompleto y una semana después se sangró a blanco al conejo. La sangre obtenida se mantuvo en reposo durante 24 h a 4°C, posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 min.

7.1 Ensayo de actividad de NADPH oxidasa en disolución

7.1.1 Determinación del tiempo de reacción y concentración de proteína en la reducción de NBT y/o XTT

Se realizaron ensayos espectrofotométricos de reducción de los colorantes de tetrazolio NBT a $\lambda_{510\text{nm}}$ y XTT a $\lambda_{470\text{nm}}$ a diferentes tiempos, utilizando vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos en medio control durante 24 h para un contenido final en la celda de reacción de 30 μg de proteína. En la figura 9A se muestra la curva de tiempo para la reducción de ambos colorantes, se encontró que la detección de la reducción de XTT fue 6 veces más sensible que la de NBT al tiempo máximo de lectura. A tiempos cortos se observó linealidad en la curva de reacción, por lo que la siguiente determinación se realizó a 10 y 20 min de iniciada la reacción. También se encontró una tendencia lineal en la reducción de NBT con respecto a la concentración de proteína (figura 9B), dado que esta tendencia se conservaba a los dos tiempos de lectura, pero los valores de absorbancia eran mayores a los 20 min de iniciada la reacción, se seleccionó el tiempo de 20 min como referencia para posteriores experimentos, los cuales se llevaron a cabo utilizando un contenido final de 30 μg de proteína por ensayo.

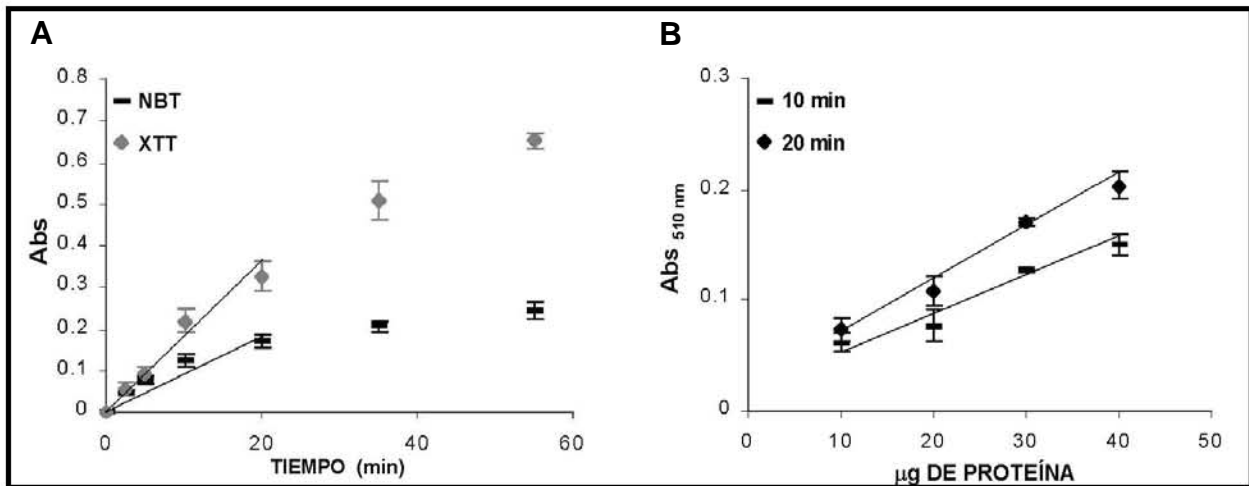


Figura 9. Condiciones de determinación del radical superóxido por membranas plasmáticas de embriones de maíz. (A) Comparación de la reducción de los colorantes de tetrazolio NBT y XTT por membranas plasmáticas de embriones de maíz con respecto al tiempo. La reacción se inició por la adición de las fracciones membranales a la mezcla de los otros componentes de reacción. (B) Reducción de NBT utilizando diferentes concentraciones de proteínas de membrana plasmática. En ambos casos, se muestran las medias y desviaciones estándar de ocho experimentos independientes, utilizando dos diferentes preparaciones membranales.

7.1.2 Efecto de la concentración de NADPH en la reducción de NBT

La figura 10A muestra el efecto de la concentración y naturaleza del sustrato en la reducción de NBT por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos durante 24 h en medio control. Se encontró que la reducción del NBT con respecto a la concentración del sustrato siguió una tendencia asintótica. La concentración de NADPH usada en posteriores experimentos fue de 0.2 mM. No se observó diferencia en la reducción de NBT cuando el sustrato usado fue NADH. A partir de los datos de la curva se calcularon los valores de $K_M = 35 \mu\text{M}$ y $V_{\text{max}} = 0.2739$ para la reducción de NBT dependiente de NADPH (figura 10B).

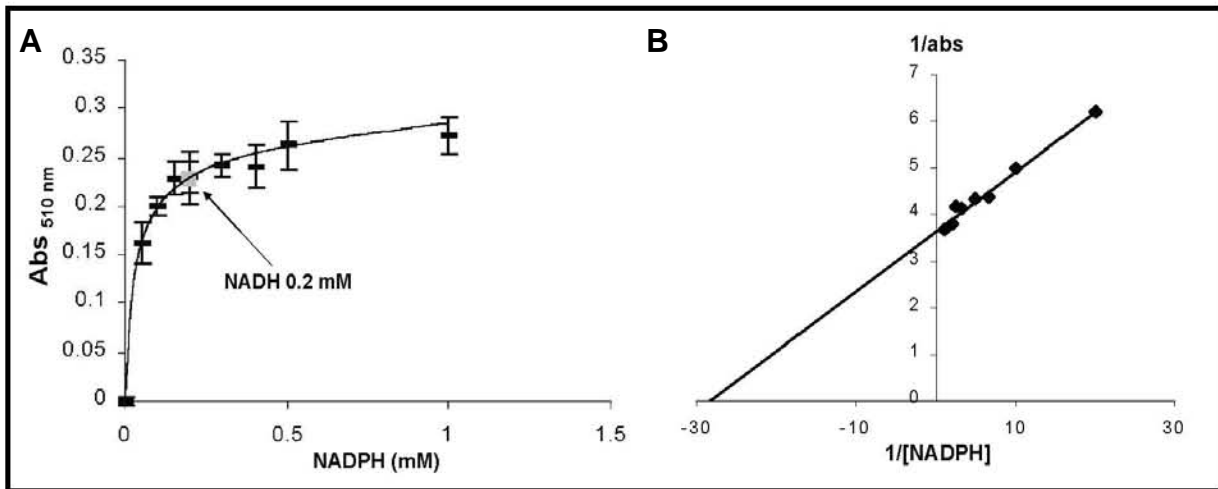


Figura 10. Cinética de reducción de NBT dependiente de la concentración de NADPH. (A) Efecto de la concentración de NADPH en la reducción de NBT por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz. (B) Representación de dobles recíprocos de los valores de la curva A. Se muestran las medias y desviaciones estándar de ocho experimentos independientes utilizando dos preparaciones membranales.

7.1.3 Efecto de la concentración de Ca^{2+} en la reducción de NBT

Se ha propuesto que la actividad de la NADPH oxidasa es regulada por Ca^{2+} (Keller, *et al.*, 1998; Sagi y Fluhr, 2001). Se estudió el efecto de la concentración este catión en la reducción de NBT por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos en medio control durante 24 h adicionando diferentes concentraciones del mismo, así como los quelantes EDTA y EGTA al medio de reacción. Se consideró como 100% de reducción la llevada a cabo en ausencia de calcio. Se encontró un ligero incremento ($12.16 \pm 6.13\%$) en el porcentaje de reducción de NBT con respecto al control cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de concentraciones iguales o mayores a 1 mM del catión, los experimentos posteriores se realizaron utilizando esta concentración. Cuando la reacción se efectuó adicionando un quelante como EDTA o EGTA en

concentraciones de 5 mM, se observó una pequeña inhibición (16.95 ± 7.48 y $16.44 \pm 15.18\%$ respectivamente) con respecto al control, lo que se muestra en la figura 11.

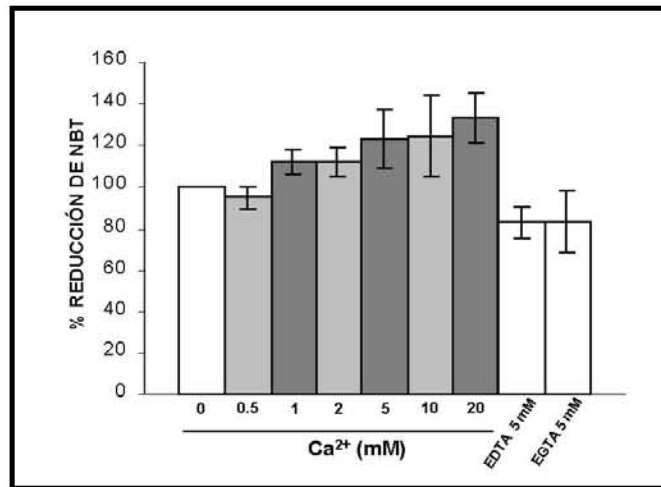


Figura 11 . Reducción de NBT por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} y 5 mM de EDTA o EGTA. Se considera como 100% de reducción del colorante la llevada a cabo en ausencia de calcio, el cual corresponde a 0.117 unidades de absorbancia. Se muestran las medias y desviaciones estándar de ocho experimentos independientes utilizando dos preparaciones membranales.

7.1.4 Efecto del DPI y SOD en la reducción de NBT y XTT

A fin de corroborar que la reducción de los colorantes de tetrazolio usados era debida al radical superóxido formado por una NADPH oxidasa, se realizaron ensayos de reducción de NBT y XTT en presencia y ausencia de DPI (50 μM) o SOD (100 y 375 u/ml). El DPI forma un aducto covalente con la flavina y de esta manera actúa como inhibidor de la NADPH oxidasa y en general de las enzimas que contienen flavina (O'Donnell *et al.*, 1993); la SOD cataliza la dismutación del radical $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 y O_2 (McCord y Fridovich, 1969), por lo que se puede usar como inhibidor en la reacción de reducción de los colorantes de tetrazolio. Se utilizaron proteínas de fracciones microsomales y de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos en medio control durante 24 h. En la figura 12A se muestran los resultados obtenidos para la reducción de NBT. Se consideró como 100% de reducción la llevada a cabo en ausencia de inhibidores, en el caso de la fracción microsomal, se observó una inhibición de la reducción de NBT debida a DPI de $73.5 \pm 3.68 \%$ con respecto al control. En presencia de concentraciones bajas de SOD (100 u/ml), la inhibición de la reducción de NBT fue de aproximadamente $78.34 \pm 1.92 \%$, mientras que a concentraciones mayores (375 u/ml), la inhibición fue de $95.35 \pm 3.68\%$ con respecto al control.

En fracciones de membrana plasmática, el porcentaje de inhibición por DPI y por bajas y altas concentraciones de SOD con respecto al control fue de $89.09 \pm 21.6\%$, $64.75 \pm 3.05\%$ y $81.53 \pm 8.02\%$ respectivamente. Los resultados de reducción de XTT en presencia o ausencia de estos inhibidores se muestran en la figura 12B. En este caso se observó una inhibición por DPI de $60.51 \pm 6.39\%$ y $72.76 \pm 9.19\%$ con respecto al control, tanto en fracciones microsomales como de membrana plasmática respectivamente. La presencia de SOD causó una inhibición dependiente de la concentración de más de 90% en ambas muestras. El porcentaje de inhibición en la reducción de NBT o XTT por DPI se consideró adecuado y debido a la mayor sencillez en el manejo de este compuesto, se utilizó como referencia en los experimentos posteriores.

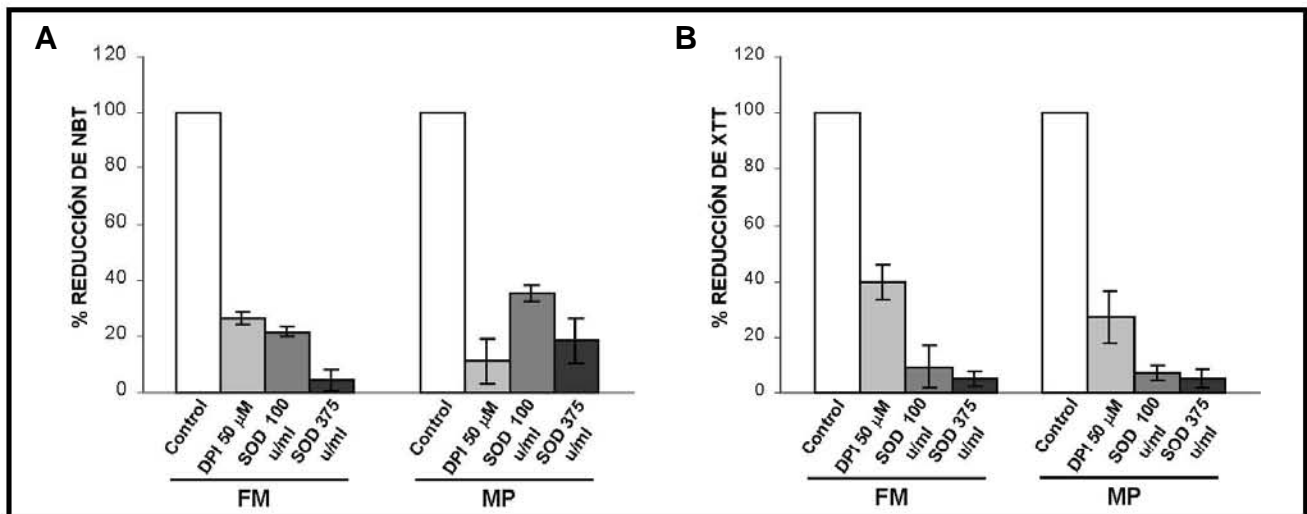


Figura 12. Efecto de los inhibidores DPI y SOD en la reducción de (A) NBT y (B) XTT por proteínas membranales de embriones de maíz (FM: fracción microsomal; MP: membrana plasmática). En (A) el 100% corresponde a 0.109 unidades de absorbancia, mientras que en (B) este porcentaje está dado por 0.456 unidades de absorbancia. Se muestran las medias y desviaciones estándar de seis experimentos independientes realizados con dos preparaciones membranales.

7.1.5 Efecto de Rotenona y NaN_3 en la reducción de NBT

Además de las ERO producidas por una planta como respuesta al ataque de patógenos, las plantas también pueden producirlas durante el metabolismo aerobio normal, por estrés ambiental o senescencia, las fuentes metabólicas de estas ERO incluyen a los cloroplastos y a las mitocondrias (Mach y Greenberg, 2004). En nuestro sistema de estudio podemos descartar a los cloroplastos como fuente del radical superóxido detectado, dado que los experimentos se llevaron a cabo usando fracciones membranales de embriones de maíz en estadios de desarrollo en los que se puede asumir que aún no hay fotosíntesis y por lo tanto la contaminación por membranas

de cloroplasto es nula. Esta consideración no puede hacerse completamente extensiva a la contaminación por membranas de mitocondria, a pesar de que éstas deberían ser separadas durante el proceso de extracción de las fracciones membranales. A fin de descartar como fuente del radical superóxido detectado durante nuestros ensayos a este organelo, se realizaron ensayos de reducción de NBT en presencia de rotenona (1 $\mu\text{g/ml}$) y NaN_3 (1mM), los cuales son inhibidores de las enzimas NADH deshidrogenasa y citocromo oxidasa, respectivamente, y cuya función podría estar catalizando la formación de radicales capaces de reducir al NBT. La reacción se efectuó utilizando vesículas de fracción microsomal de embriones de maíz embebidos durante 24 h en medio control; no se observó inhibición en la reducción de NBT cuando las proteínas fueron incubadas en presencia de rotenona o NaN_3 durante los 15 min previos al inicio de la reacción. Cuando las muestras fueron incubadas en presencia de DPI (50 μM), se observó una inhibición en la reducción de NBT de $32.78 \pm 2.04\%$ con respecto al control. En la figura 13 se muestran los resultados de estos experimentos.

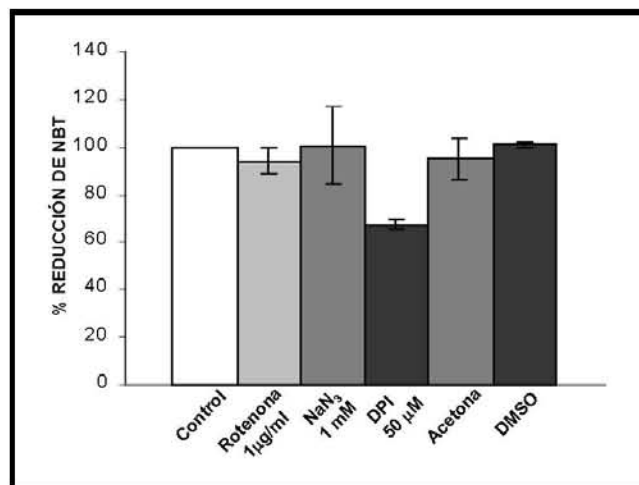


Figura 13. Efecto de los compuestos Rotenona, NaN_3 y DPI en la reducción de NBT por proteínas de fracción microsomal de embriones de maíz. La rotenona se disolvió en acetona y el DPI en DMSO. El 100% corresponde a 0.1801 unidades de absorbancia. Se muestran las medias y desviaciones estándar de cuatro experimentos independientes realizados con una preparación membranar.

7.1.6 Reducción de NBT y XTT por vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos en presencia de FB_1 , SN o PS durante 24 h

A fin de determinar el efecto de la FB_1 y de los compuestos esfingoides SN y PS en la actividad de la NADPH oxidasa, se embebieron embriones de maíz en presencia de estos compuestos a una concentración de 20 μM durante 24 h. La figura 14 muestra los resultados del

porcentaje de reducción de NBT y XTT en presencia y ausencia de DPI (50 μ M) por proteínas de membrana plasmática de los embriones de maíz sometidos a este tratamiento. Se observó un aumento en la reducción de NBT con respecto al control de $50.2 \pm 4.85\%$ debido a vesículas de embriones que fueron embebidas en presencia de FB_1 y de $83.18 \pm 6.05\%$ por vesículas provenientes de los embriones que fueron embebidos en presencia de SN. Cuando los embriones se embebieron en presencia de PS el porcentaje de reducción del colorante fue de $95.87 \pm 1.75\%$ con respecto al control (figura 14A).

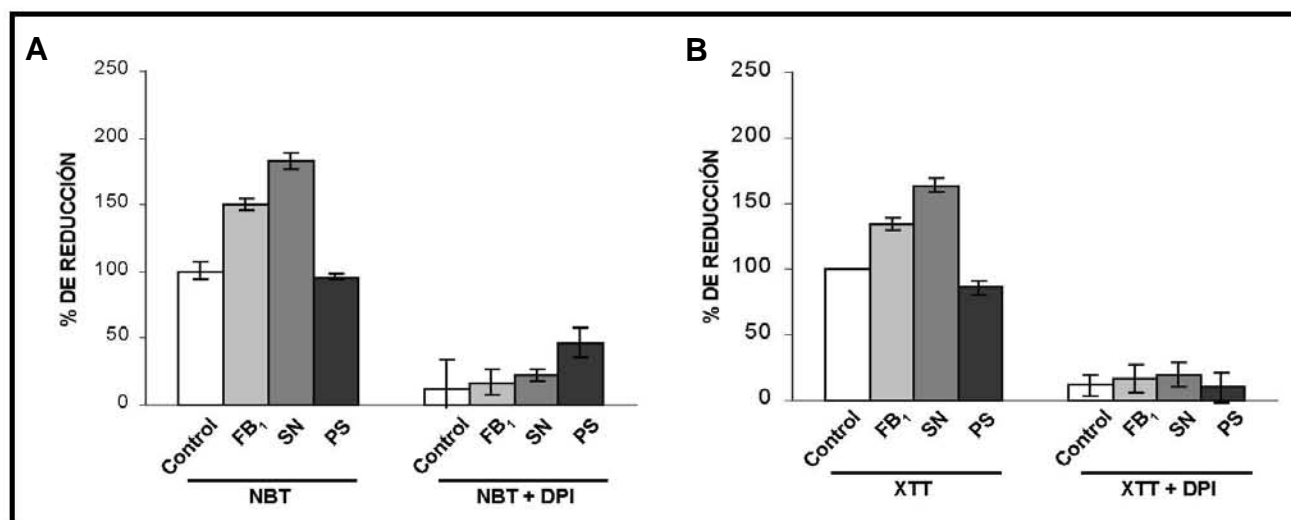


Figura 14. Reducción de colorantes de tetrazolio en presencia o ausencia de DPI por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos 24 h en presencia de FB_1 , SN o PS. (A) Reducción de NBT, el 100% de reducción corresponde a 0.109 unidades de absorbancia. (B) Reducción de XTT, el 100% de reducción corresponde a 0.351 unidades de absorbancia. Se muestran las medias y desviaciones estándar de seis experimentos independientes realizados con dos diferentes preparaciones membranales.

Cuando el colorante empleado fue XTT (figura 14B), se encontró un aumento en la reducción del mismo con respecto al control de $34.68 \pm 4.85\%$ por vesículas de embriones embebidos en presencia de FB_1 y de $64.28 \pm 5.05\%$ por vesículas de embriones embebidos en presencia de SN. Mientras que el porcentaje de reducción del colorante por vesículas de los embriones embebidos en presencia de PS fue de $85.99 \pm 5.05\%$. Cuando las vesículas de membrana fueron incubadas previamente al inicio de la reacción en presencia de 50 μ M DPI, se encontraron porcentajes de inhibición de entre $53.52 \pm 11.3\%$ y $89.75 \pm 11.32\%$.

7.1.7 Reducción de NBT y XTT por vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos en presencia de diferentes concentraciones de FB₁ o SN

Para conocer el efecto de la concentración de FB₁ y SN en la reducción de NBT y XTT por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz, éstos fueron embebidos en medios que contenían 10 ó 20 µM de los mismos durante 24 h. En la figura 15 se presentan los resultados obtenidos de estos experimentos. Como se había establecido previamente, se encontró un aumento en la reducción de NBT y XTT de $50.2 \pm 4.85 \%$ y de $34.68 \pm 4.85\%$ respectivamente, en vesículas de embriones embebidos en presencia de 20 µM FB₁ con respecto al control, y de $83.18 \pm 6.05\%$ y $64.28 \pm 5.05\%$, respectivamente, en el caso de las vesículas de embriones embebidos en presencia de 20 µM SN.

Cuando se emplearon vesículas de embriones que fueron embebidos en 10 µM FB₁, los porcentajes de reducción de NBT y XTT fueron $67.27 \pm 8.57\%$ y $66.12 \pm 3.34\%$ respectivamente con respecto al control. Las vesículas provenientes de embriones embebidos en presencia de 10 µM SN redujeron el NBT y XTT $97.25 \pm 6.06\%$ y $91.73 \pm 9.58\%$ respectivamente. Las vesículas de embriones que fueron embebidos en 20 µM de FB₁ o 20 µM SN y que fueron incubados en presencia de 50 µM de DPI mostraron una inhibición de entre 77.53 y 83.04 % en la reducción de colorantes de tetrazolio.

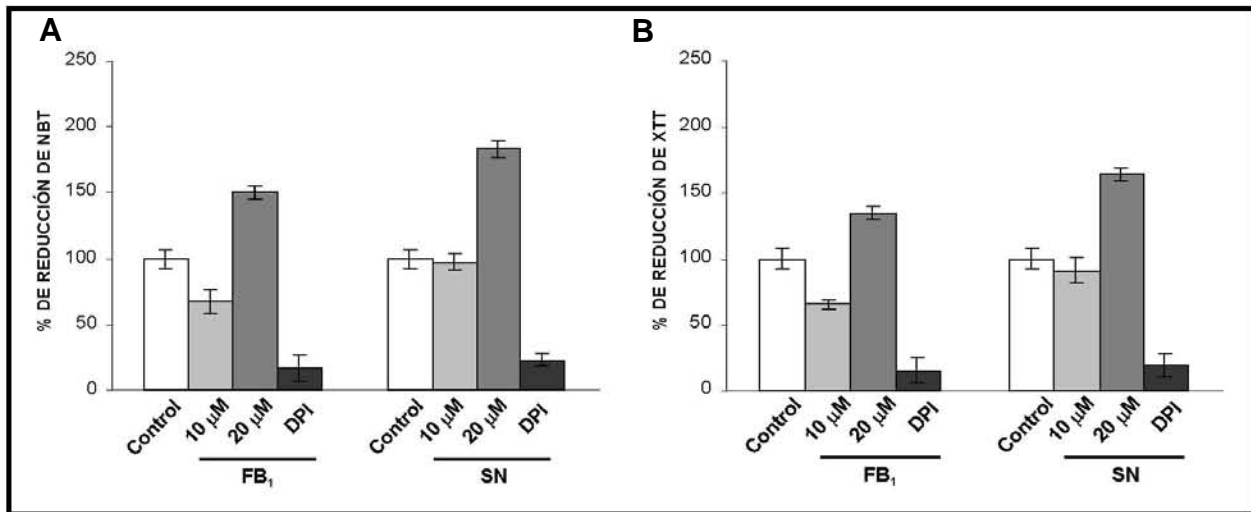


Figura 15. Reducción de NBT y XTT en presencia o ausencia de DPI por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos 24 h en presencia de FB₁ o SN a concentraciones de 10 ó 20 µM. (A) Reducción de NBT. El 100% de reducción corresponde a 0.109 unidades de absorbancia. (B) Reducción de XTT. El 100% de reducción corresponde a 0.351 unidades de absorbancia. Se muestran las medias y desviaciones estándar de seis experimentos independientes realizados con dos diferentes preparaciones membranales.

7.1.8 Reducción de NBT por vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos en medio control durante 24 h y expuestas a FB₁ o SN *in vitro*

En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio (Gutiérrez-Nájera, no publicado), no se encontró FB₁ remanente en la membrana plasmática de embriones de maíz que fueron expuestos a 10 μM de la toxina durante 24 h, sin embargo, se encontró un aumento de casi siete veces en el nivel de SN detectada en membrana plasmática y de casi ocho veces en el contenido de PS detectada en fracción microsomal. Cuando los embriones fueron embebidos en presencia de FB₁ en una concentración de 20 μM durante 24 h, se detectaron aproximadamente 0.34 pmolas del compuesto por mg de proteína membranal de la muestra (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido de FB₁, SN y PS en fracciones membranales de embriones de maíz embebidos durante 24 h en 10 ó 20 μM de FB₁ (Gutiérrez-Nájera no publicado).

	FB ₁ (pmol mg proteína ⁻¹)		SN (pmol mg proteína ⁻¹)		PS (pmol mg proteína ⁻¹)	
	Microsomos	Membrana plasmática	Microsomos	Membrana plasmática	Microsomos	Membrana plasmática
Control	---	---	1040 ± 240	1036 ± 210	278 ± 80	8995 ± 730
10 μM FB ₁	50 ± 17	No detectada	1365 ± 455	7570 ± 960	2370 ± 900	7460 ± 1750
20 μM FB ₁	---	0.34 ± 0.03	¿?	¿?	¿?	¿?

Nuestros resultados previos mostraban un incremento de hasta el 50.2 ± 4.85% en la reducción de colorantes de tetrazolio por proteínas de membranas plasmáticas de embriones de maíz embebidos durante 24 h en 20 μM de FB₁ y de hasta 83.18 ± 6.05% cuando los embriones fueron embebidos en presencia de 20 μM de SN. A fin de determinar si el aumento en la producción del radical superóxido registrado era debido a la FB₁ remanente en la membrana plasmática de los embriones expuestos a ella o al exceso de esfingánina acumulado por la acción de la toxina o por exposición de los embriones a la misma, se realizaron experimentos agregando estos compuestos *in vitro* a vesículas de membranas de embriones de maíz embebidos en medio control durante 24 h. De acuerdo a los datos de la tabla 3, se estableció que la cantidad de FB₁ que estaría presente en una celda con un volumen final de 800 μl y 30 μg de proteína sería de 0.01 pmol, no conocemos la cantidad total de SN que se encontraría en la membrana plasmática después de beber en 20 μM de FB₁ o SN durante 24 h a los embriones, sin embargo, basándonos en que el aumento de la misma es de ocho veces cuando los embriones fueron

embebidos en 10 μM de FB_1 , adicionamos una cantidad 10 veces mayor de lo que se esperaba encontrar de FB_1 , es decir 0.1 pmol. La figura 16 muestra los resultados de la reducción de NBT por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos en medio control durante 24 h y expuestos a FB_1 o SN *in vitro* junto con los resultados obtenidos por la exposición *in vivo* de los embriones a los mismos compuestos. Se encontró que la adición *in vitro* de 0.01 pmol de FB_1 inhibió la reducción de NBT en $95.4 \pm 1.1\%$ con respecto al control, en contraste con la activación de $50.2 \pm 4.85\%$ encontrada cuando los embriones fueron expuestos a la toxina *in vivo*. La exposición *in vitro* de las vesículas de membrana plasmática a SN también produjo una inhibición en la reducción de NBT de $10.48 \pm 6.06\%$, comparada con la activación de $83.18 \pm 6.05\%$ producida por vesículas de embriones expuestos al compuesto *in vivo*.

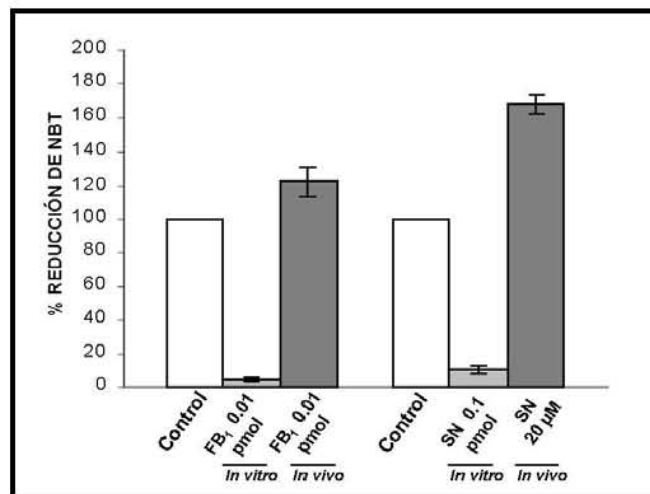


Figura 16. Reducción de NBT por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos 24 h en medio control y expuestos a FB_1 y SN *in vitro* e *in vivo*. El 100% de reducción corresponde a 0.21 unidades de absorbancia. Se muestran las medias y desviaciones estándar de seis experimentos independientes realizados con dos diferentes preparaciones membranales.

7.1.9 Reducción de NBT y XTT por fracciones microsomales de embriones de maíz sin germinar embebidos durante 3, 6 ó 12 h en presencia de FB_1

Con objeto de estudiar la temporalidad de la explosión oxidativa presentada por proteínas de membrana plasmática de los embriones de maíz expuestos a 20 μM de FB_1 se realizó la determinación de la reducción de los colorantes NBT y XTT por proteínas de fracciones membranales de embriones de maíz embebidos en estas condiciones durante 3, 6 ó 12 h. Debido a las dificultades experimentales que representaba la obtención de membranas plasmáticas de embriones embebidos en las diferentes condiciones, los experimentos se realizaron utilizando

fracciones microsomales. En la figura 17 se muestran los resultados de estos experimentos. Se observó un incremento de 42.08 ± 31.16 y $50.99 \pm 26.06\%$ en la reducción de NBT respecto al control en las muestras de embriones embebidos en presencia de FB_1 durante 6 ó 12 h respectivamente. No se observó diferencia significativa en la reducción de NBT debida a los embriones que fueron embebidos durante 3 h en presencia de la toxina (figura 17A).

En la reducción de XTT por proteínas de fracciones microsomales de estos embriones, se observó un incremento con respecto al control de 39.63 ± 3.36 y $40.78 \pm 12.89\%$ en la reducción del colorante debida a microsomas de embriones que fueron embebidos en presencia de FB_1 durante 3 y 12 h respectivamente, no se observaron diferencias significativas con respecto al control en la reducción del mismo debida a microsomas de embriones que fueron expuestos a la toxina durante 6 h (figura 17B).

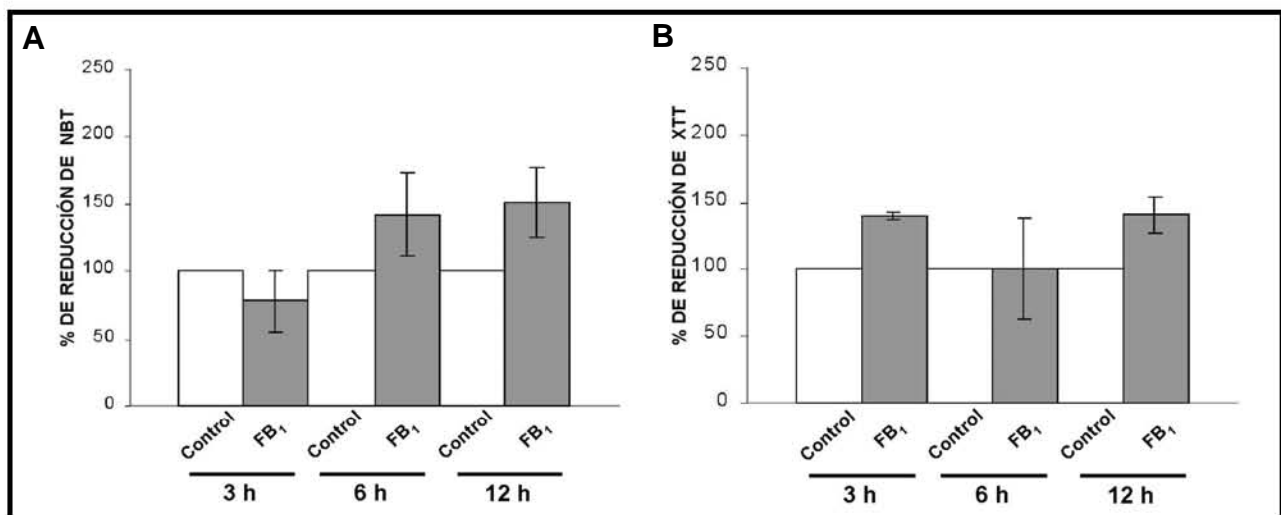


Figura 17. Reducción de los colorantes de tetrazolio NBT (A) y XTT (B) por proteínas de fracción microsomal de embriones de maíz sometidos a imbibición continua durante 3, 6 ó 12 h en presencia o ausencia de FB_1 . Se muestran las medias y desviaciones estándar de cuatro experimentos independientes realizados con una preparación membranal.

7.1.10 Reducción de NBT y XTT por fracciones microsomales de embriones de maíz embebidos durante 22 h en medio control y transferidos a un medio con FB_1 , SN o PS durante 3, 6 ó 12 h adicionales.

Dado que los resultados de la reducción de NBT y XTT por proteínas de fracciones microsomales de los embriones no germinados embebidos durante tiempos cortos en presencia de FB_1 no proporcionaban información clara sobre la temporalidad de la explosión oxidativa, se cambiaron las condiciones de exposición de los embriones a los compuestos, para este fin se

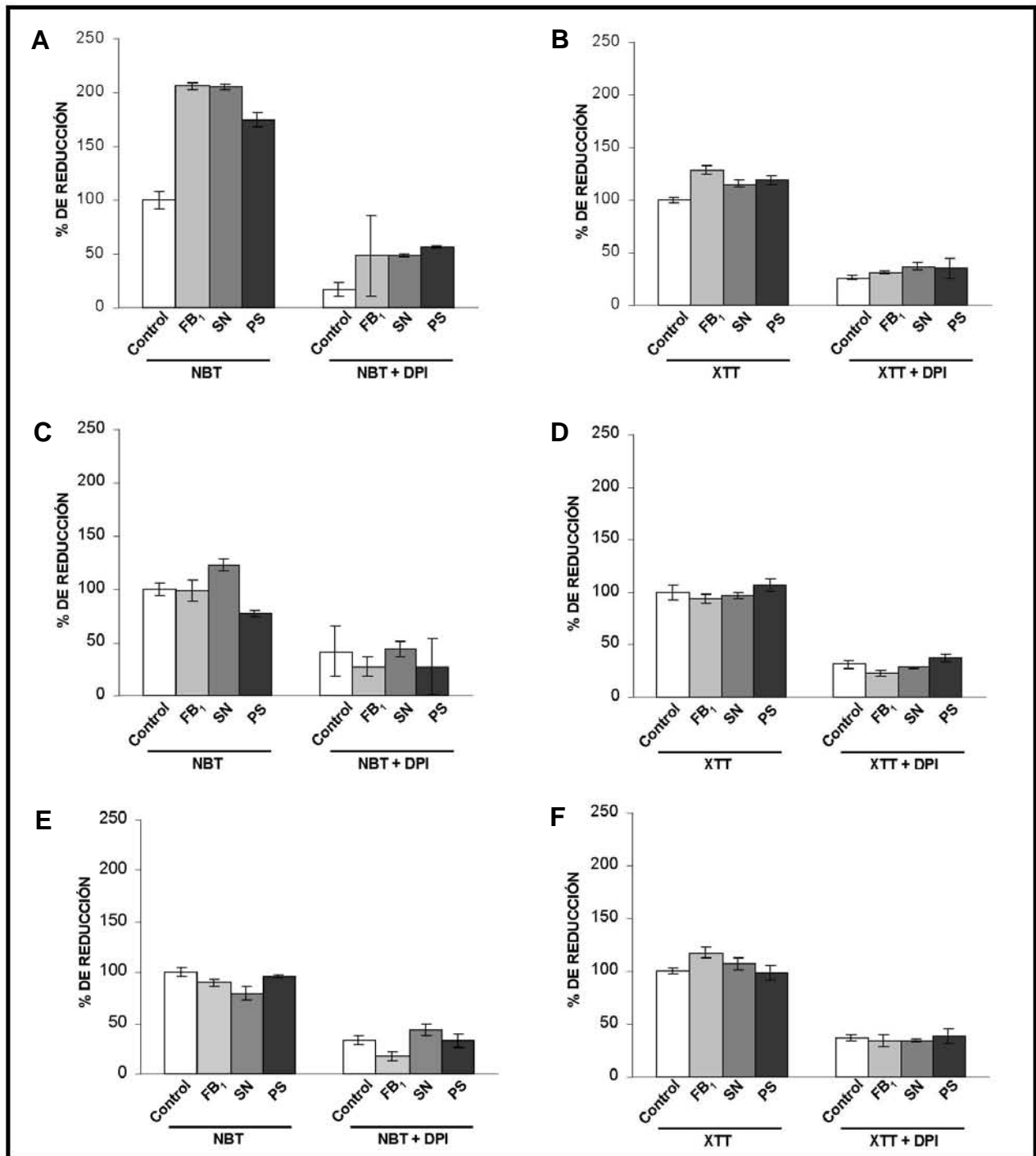


Figura 18. (A), (C) y (E) Reducción de NBT debida a proteínas de embriones embebidos 22 h en medio control y transferidos a medios que contenían FB₁, SN o PS durante 3, 6, ó 12 h más respectivamente. El 100% de reducción corresponde, en ese orden, a 0.075, 0.067 y 0.130 unidades de absorbancia. (B), (D) y (F) Reducción de XTT. El 100% de reducción corresponde, en ese orden, a 0.316, 0.303 y 0.247 unidades de absorbancia. Se muestran las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes realizados con una preparación membranaral.

incubaron embriones de maíz durante 22 h en medio control y posteriormente fueron transferidos durante 3, 6, ó 12 h adicionales a medios que contenían FB₁, SN o PS en una concentración 20 μM. En la figura 18 se muestran los resultados de estos experimentos, los cuales, como en el caso anterior se realizaron utilizando vesículas de fracciones microsomales. Se observó un incremento de $106.04 \pm 3.74\%$ en la reducción de NBT por vesículas de embriones embebidos en presencia de 20 μM de FB₁ durante tres horas, de $104.70 \pm 2.69\%$ cuando los embriones fueron embebidos en presencia de 20 μM SN y de $74.50 \pm 6.65\%$ cuando el compuesto fue PS 20 μM (figura 18A).

En el caso de los experimentos en que el colorante empleado fue XTT, el aumento en la reducción del mismo fue de 28.27 ± 4.33 , 15.41 ± 3.26 y $19.56 \pm 4.07\%$ cuando se usaron fracciones microsomales obtenidas de embriones embebidos en presencia de FB₁, SN y PS durante tres horas respectivamente (figura 18B). Los tiempos de imbibición de los embriones durante 6 ó 12 h en presencia de los compuestos esfingoideos no revelaron ninguna diferencia significativa con respecto al control ni cuando el colorante empleado fue NBT (figuras 18C, E) ni cuando se trató de XTT (figuras 18D, F). La inhibición por DPI fue, en todos los casos, de entre el 82.55 ± 6.68 y $43.63 \pm 1.43\%$.

7.2 Ensayo de actividad de NADPH oxidasa en gel

7.2.1 Detección de proteínas que catalizan la reducción de NBT dependiente de NADPH en fracciones de membrana plasmática de embriones de maíz y hojas de tabaco

El ensayo en gel para la detección de actividad de la NADPH oxidasa consiste en la separación electroforética en geles desnaturalizantes y posterior renaturalización de proteínas que catalizan la reducción de NBT. Se realizaron ensayos de actividad de NADPH oxidasa en gel en presencia de diferentes concentraciones de NADPH (resultados no mostrados) en los cuales se observó que el tiempo de aparición de las bandas de formazán era dependiente de la concentración del sustrato, no se observaron bandas de actividad en ausencia de NADPH o cuando el sustrato usado fue NADH. No se apreció diferencia significativa en la intensidad de las bandas cuando el ensayo se realizó en presencia de diferentes concentraciones de calcio (resultados no mostrados).

En la figura 19 se muestran las proteínas de microsomas y membrana plasmática de embriones de maíz y hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, *Nt*) separadas electroforéticamente y posteriormente renaturalizadas. Las muestras de tabaco se usaron como control positivo de la presencia de NADPH oxidasa, ya que han sido reportadas dos bandas con actividad de NADPH oxidasa de aproximadamente 103-106 y 80-75 kDa en fracciones de membrana plasmática de

esta especie (Sagi y Fluhr, 2001). En el ensayo se lograron detectar dos bandas de formazán dependientes de NADPH con una masa molecular de aproximadamente 63 y 120 kDa respectivamente en fracciones membranales de tabaco. Cuando se usaron fracciones membranales de embriones de maíz embebidos durante 24 h en medio control se detectó una banda de aproximadamente 63 kDa (figura 19B). Tanto en las fracciones membranales de hojas de tabaco, como en las de embriones de maíz, la intensidad de las bandas fue ligeramente mayor en las muestras de membrana plasmática que en las de la fracción microsomal. Además, durante incubaciones prolongadas con el colorante, se detectaron bandas de formazán correspondientes a proteínas de menor peso molecular (≈ 35 kDa), el tamaño de las proteínas fue variable en la mayoría de los casos.

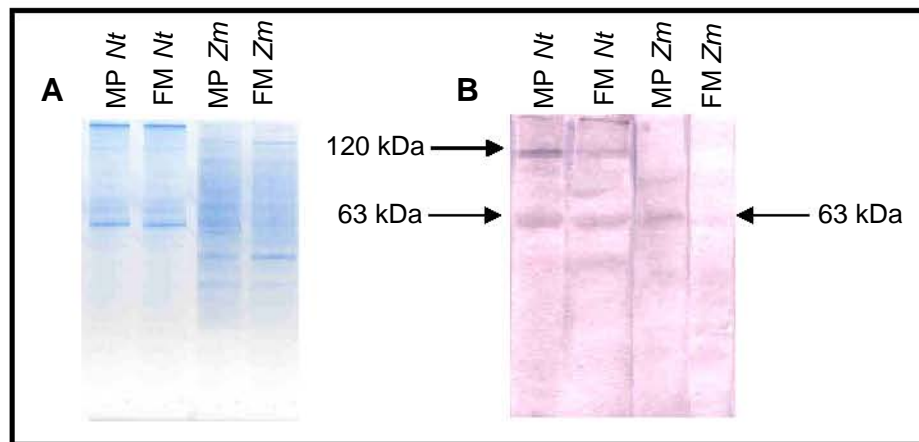


Figura 19. Determinación de actividad de NADPH oxidasa en gel usando proteínas de fracción microsomal (FM) y de membrana plasmática (MP) de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, *Nt*) y de embriones de maíz (*Zea mays*, *Zm*) embebidos 24 h. (A) Gel teñido con Azul de Coomasie, se cargaron 25 μ g de proteína en cada carril. (B) Ensayo de actividad en gel, se cargaron 100 μ g de proteína en cada carril. Se señalan las principales bandas de actividad detectadas.

7.2.2 Efecto de DPI y SOD en la reducción de NBT dependiente de NADPH catalizada por proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz

Para corroborar que las bandas de actividad detectadas en el gel correspondían a bandas de formazán producidas por la reducción de NBT debida a la formación del radical superóxido catalizada por una enzima de membrana plasmática dependiente de NADPH se realizó el ensayo de actividad en gel incubándolo durante una hora en presencia de 50 μ M de DPI o 100 u/ml de SOD antes de la detección de actividad.

En la figura 20 se muestran las imágenes escaneadas de los geles sometidos a este tratamiento. En el ensayo de actividad se detectaron las bandas de 63 y 120 kDa

correspondientes a las encontradas previamente en tabaco y la banda de 63 kDa presente en fracciones membranales de maíz. No se detectaron bandas de formazán cuando el gel fue preincubado en presencia de DPI o SOD.

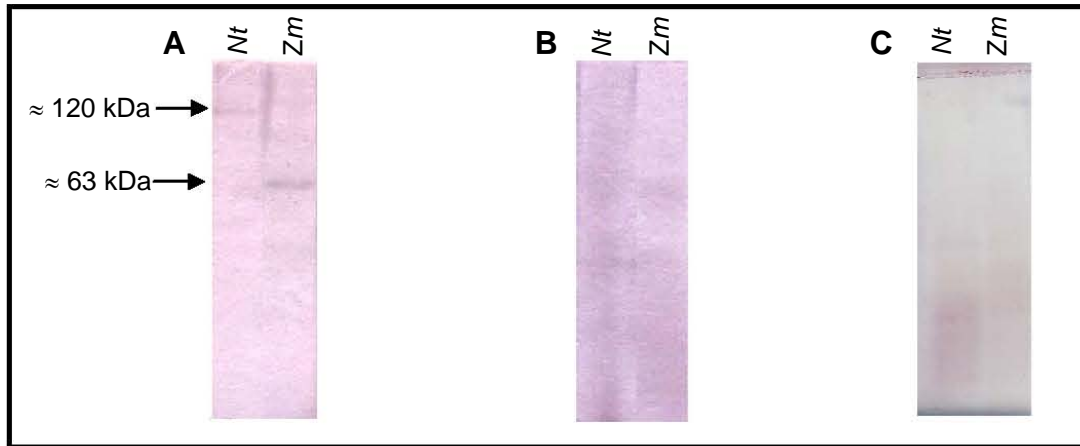


Figura 20. Determinación de actividad de NADPH oxidasa en gel usando proteínas de membrana plasmática de hojas de tabaco y embriones de maíz. (A) Ensayo de actividad en gel. Se señalan las principales bandas de actividad. (B) y (C) Ensayo de actividad en presencia de DPI (50 μ M) y SOD (100 u/ml) respectivamente. En todos los casos se cargaron 100 μ g de proteína en cada carril.

7.2.3 Reducción de NBT en gel por fracciones de membrana plasmática de embriones de maíz expuestos a FB₁, SN o PS durante 24 h

El efecto de la FB₁ y los compuestos esfingoideos SN y PS en la producción del radical superóxido por proteínas membranales de embriones de maíz se analizó en geles de actividad en los cuales se usaron vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz que fueron embebidos en estos compuestos. La figura 21 muestra un gel de actividad representativo de estos experimentos, en el cual se cargaron vesículas de membrana plasmática de embriones embebidos durante 24 h en presencia de FB₁, SN y PS en una concentración final del compuesto de 20 μ M. Se señala la principal banda de formazán detectada con un peso molecular aproximado de 63 kDa (figura 21B). No se encontró diferencia apreciable en la intensidad de la banda correspondiente a proteínas extraídas de embriones embebidos en presencia de los compuestos con respecto a la de los embriones embebidos en medio control.

Cuando el ensayo se realizó utilizando vesículas de membrana plasmática de embriones embebidos en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos o durante diferentes

tiempos de exposición a los mismos, tampoco se detectaron diferencias en la intensidad de las bandas de formazán o en el tiempo de aparición de las mismas (resultados no mostrados).

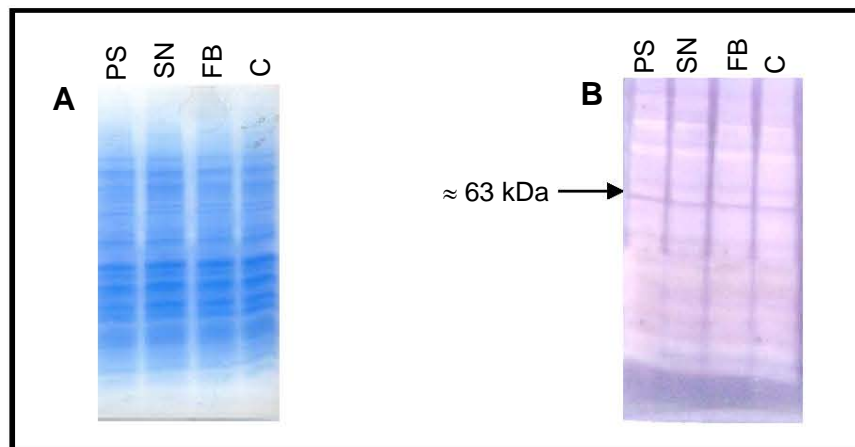


Figura 21. Determinación de actividad de NADPH oxidasa en gel usando proteínas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos 24 h en presencia de FB₁, SN o PS a una concentración de 20 μ M. (A) Gel teñido con Azul de Coomasie. Se cargaron 25 μ g de proteína en cada carril. (B) Ensayo de actividad en gel. Se cargaron 100 μ g de proteína en cada carril. Se señala la principal banda con actividad.

7.3 Búsqueda de una secuencia de aminoácidos conservada y antigénica para la NADPH oxidasa de células vegetales

Se realizó la búsqueda de secuencias de aminoácidos para homólogos de la NADPH oxidasa en las bases de datos de NCBI y Swiss Prot y se hizo una selección de las secuencias correspondientes a especies vegetales, posteriormente se realizó el alineamiento y se obtuvo el árbol filogenético correspondiente para dichas secuencias (figura 22A), y a partir del cual se hizo una nueva selección de 11 secuencias representativas, incluyendo un fragmento de una secuencia de nucleótidos de maíz putativa para esta enzima previamente traducido. A estas secuencias se les determinaron las regiones antigénicas con ayuda de los algoritmos de Hopp/Woods, Parker y Welling (figura 22B), así como del programa Bioinformatics, con lo cual se seleccionó un fragmento de 15 aminoácidos (CTSVYEEGDARSALI) localizado en la región del carboxilo terminal de la enzima figura 22D), mismo que fue sintetizado y conjugado a hemocianina de lamprea por la compañía Neo MPS, Inc. (San Diego, California, EU). Esta fracción se inoculó a conejos y posteriormente se obtuvo el suero con el que se realizaron las pruebas de reactividad del suero contra las proteínas de membrana plasmática como antígenos en inmunorélicas. Todos estos procedimientos se describen más ampliamente en la sección Materiales y Métodos.

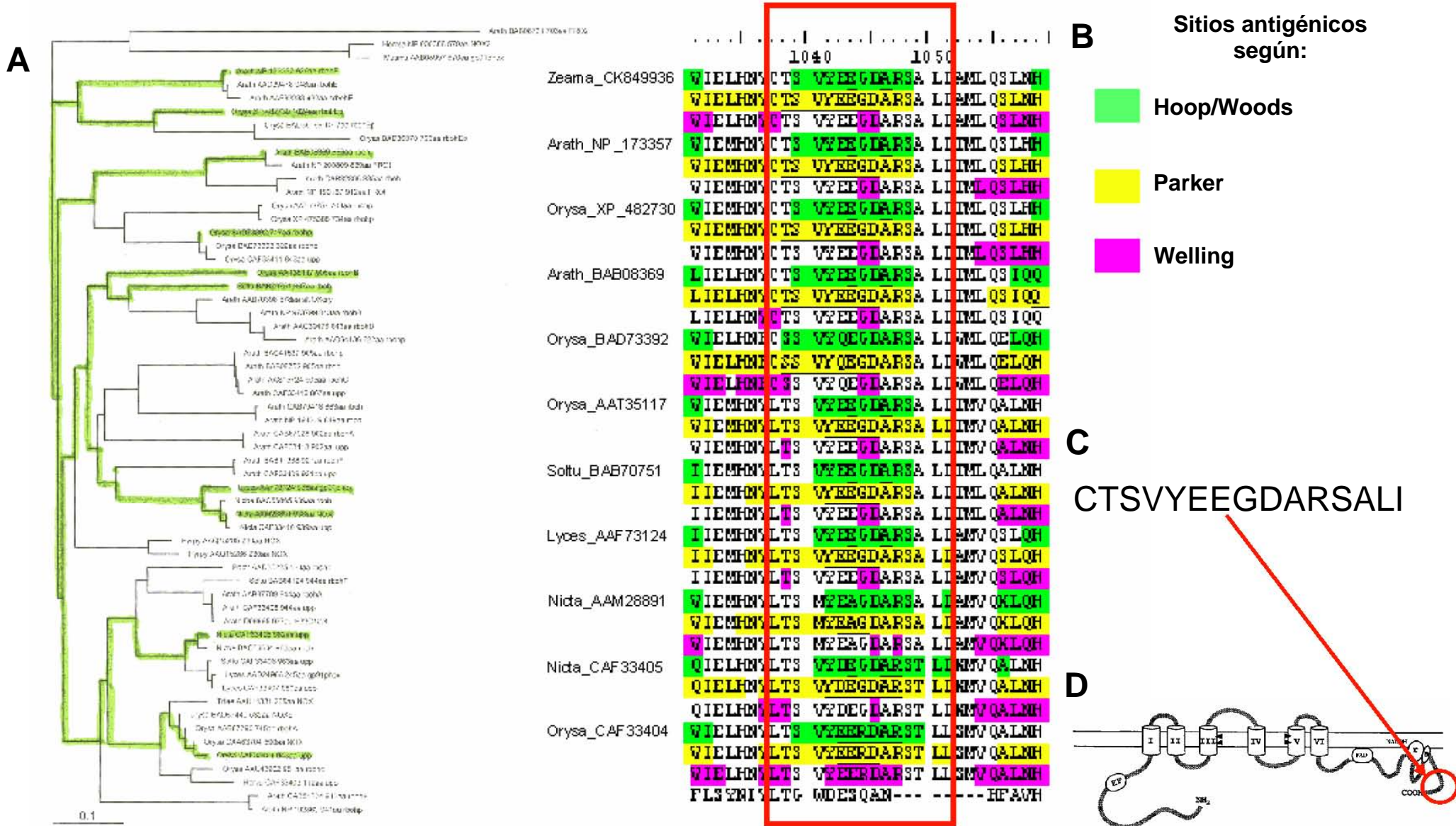


Figura 22. (A) Arbol filogenético que agrupa 56 secuencias de aminoácidos correspondientes a NADPH oxidasas de diferentes especies vegetales, más dos correspondientes a la subunidad gp91^{phox} de mamíferos (humano y ratón) y una correspondiente a una reductasa férrica de Arabidopsis. (B) Sección del alineamiento correspondiente a una porción de la región del extremo carboxilo terminal, en la que se señalan las principales regiones antigénicas según los algoritmos de Hoop/Woods, Parker y Welling, respectivamente. Dentro del recuadro se señala el segmento elegido para la síntesis del péptido antigénico. (C) Secuencia de aminoácidos elegida para la síntesis del polipéptido antigénico contra la NADPH oxidasa. (D) Estructura propuesta para la NADPH oxidasa de plantas donde se señala la localización del péptido antigénico elegido

7.4 Pruebas de optimización del procedimiento de inmunoréplica

7.4.1 Pruebas de especificidad del anticuerpo

Se realizaron diferentes ensayos de réplica en Western utilizando fracciones microsomales de embriones de maíz y de hojas de tabaco y empleando el suero inmune obtenido. Las pruebas se realizaron a diferentes diluciones a fin de determinar la concentración óptima de anticuerpo para detectar a la enzima de manera específica. Las diluciones evaluadas fueron desde 1:250 hasta 1:30 000; la mejor dilución a la cual se pudo detectar la NADPH oxidasa en ambas muestras fue 1:3 000. En la figura 23 se muestran dichos ensayos.

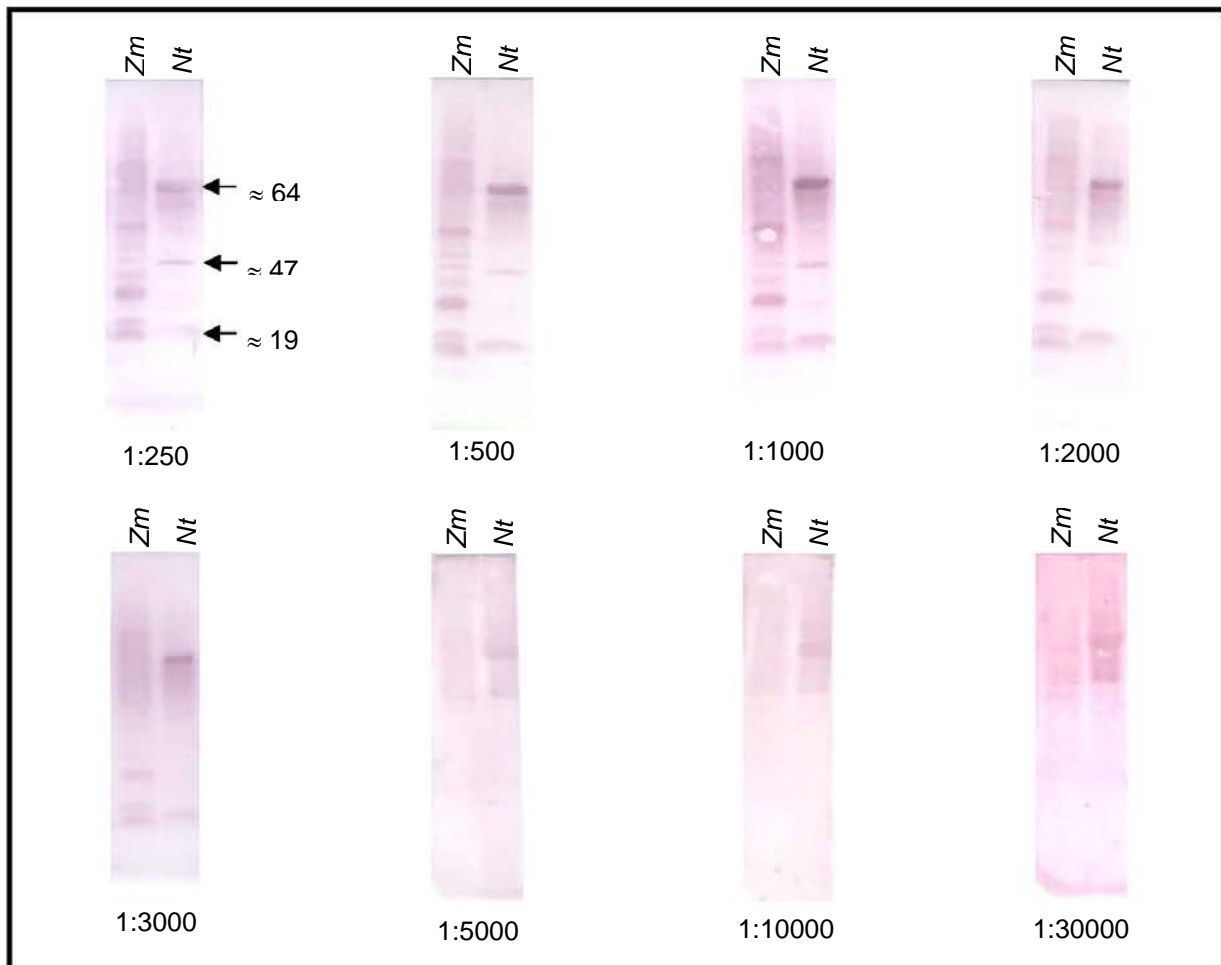


Figura 23. Ensayos de réplica en Western para titular la reactividad de fracciones microsomales de embriones de maíz y hojas de tabaco contra el suero obtenido del conejo inmunizado con el péptido integrado y acoplado a hemocianina de lamprea. Todos los ensayos se realizaron utilizando 25 μ g de proteínas, la saturación de los sitios inespecíficos se hizo con 2% de leche en polvo. Se señalan los pesos moleculares de algunas bandas de proteína detectadas por el anticuerpo. La dilución del suero empleada se señala en cada caso.

7.4.2 Condiciones de eliminación de reactividad inespecífica del anticuerpo

Se evaluaron diferentes condiciones de saturación de los sitios inespecíficos de la membrana de PVDF o bloqueo utilizando disoluciones de leche descremada en polvo (Svelty) disuelta en TBS en concentraciones de 2%, 3.5% y 5% (p:v) y utilizando suero inmune obtenido en diluciones de 1:3000. La concentración de leche a la cual se pudo detectar la NADPH oxidasa con mayor claridad fue de 5%. En la figura 24 se muestran dichos ensayos.

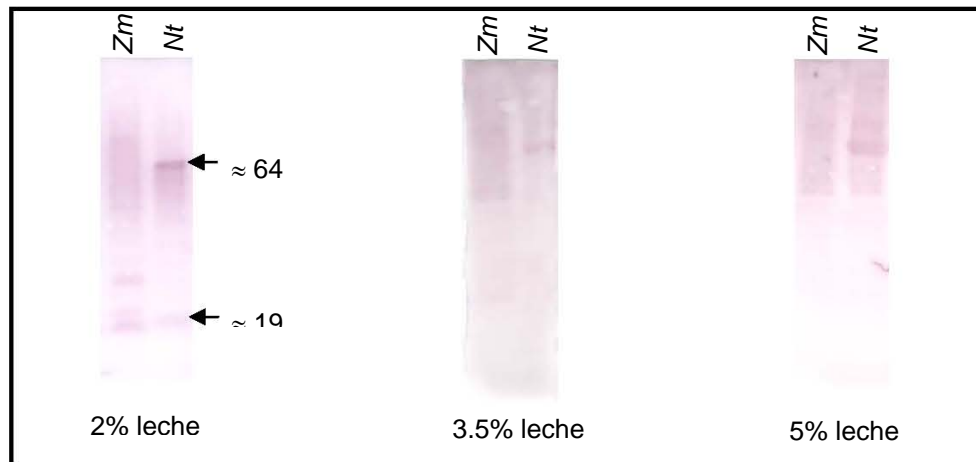


Figura 24. Ensayos de réplica en Western para evaluar la reactividad del suero obtenido del conejo inmunizado con el péptido integrado y acoplado a hemocianina de lamprea. En todos los casos se utilizaron 25 μ g de proteínas de fracciones microsomales de embriones de maíz y hojas de tabaco en una dilución 1:3000 del suero antigénico. Las diferentes concentraciones de leche utilizadas para eliminar los sitios inespecíficos al anticuerpo en la membrana de PVDF se señalan en todos los casos, así como los pesos moleculares de algunas bandas de proteína detectadas por el anticuerpo.

7.4.3 Detección de la NADPH oxidasa en microsomas de células vegetales

Se realizaron ensayos de réplica en Western utilizando microsomas de células vegetales y el anticuerpo contra la NADPH oxidasa obtenido en las condiciones evaluadas. En la figura 25 se muestran un gel de actividad de NADPH oxidasa y una inmunoréplica utilizando vesículas de fracción microsomal de una especie vegetal dicotiledónea (tabaco) y una monocotiledónea (maíz). Se observan en el ensayo de actividad las bandas con pesos moleculares de 63 y 120 kDa previamente detectadas en fracciones membranales de tabaco y la banda de proteína de 63 kDa presente en fracciones membranales obtenidas a partir de embriones de maíz. En el ensayo de réplica en Western se detectó una banda de aproximadamente 63 kDa en ambos casos, al igual que en el ensayo de actividad, la intensidad de la banda es mayor en muestras de tabaco que en las correspondientes a maíz. La banda de 120 kDa con actividad de NADPH oxidasa detectada por el ensayo en gel no pudo identificarse en el ensayo de réplica en Western. Cuando se

utilizaron proteínas de fracción microsomal de hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris*, var Canario) en el ensayo de actividad en gel se observaron dos bandas de actividad de aproximadamente 72 y 62 kDa respectivamente, las cuales pudieron ser reconocidas por el anticuerpo contra NADPH oxidasa, la intensidad de estas bandas fue muy similar a la de la banda correspondiente de hojas de tabaco, estos resultados no se muestran aquí.

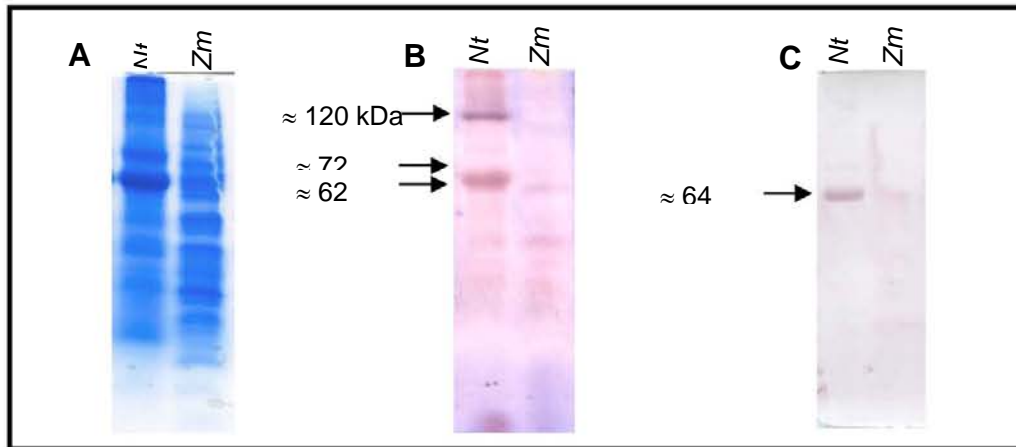


Figura 25. Detección de reducción de NBT por proteínas de fracciones microsomales de tabaco y maíz. (A) Gel teñido con Azul de Coomasie. Se cargaron 25 μ g de proteína en cada carril. (B) Ensayo de actividad en gel. Se cargaron 100 μ g de proteína en cada carril, se señalan los pesos moleculares de las principales bandas de actividad detectadas. (C) Réplica en Western. Se cargaron 25 μ g de proteína en cada carril, se señalan los pesos moleculares de las proteínas detectadas por el anticuerpo y que presentan reducción de NBT.

Entre las reacciones primarias presentadas por una planta en respuesta al ataque de patógenos se encuentra la producción de especies reactivas de oxígeno. Desde que Doke (1983) reportó por primera vez la generación del anión superóxido durante las interacciones incompatibles (resistencia de la planta) entre células en suspensión de *Solanum tuberosum* y el patógeno *Phytophthora infestans*, las ERO han sido detectadas repetidas veces como parte de la respuesta de resistencia a la enfermedad de una planta. Se ha observado que las ERO aplicadas exógenamente pueden actuar de manera sinérgica en una ruta de amplificación de señales con ácido salicílico para llevar a la muerte celular hipersensible (HR, Draper, 1997; Shirasu *et al.*, 1997), por lo que se ha propuesto que estas especies orquestan el establecimiento de la respuesta de defensa en plantas que acompaña frecuentemente al reconocimiento satisfactorio de un patógeno (Levine *et al.*, 1994; Apóstol *et al.*, 1999). De la misma manera, niveles coordinados de ERO y óxido nítrico (NO) son necesarios para producir HR (Delledone *et al.*, 2001), y ambos pueden estar relacionados con el cierre de estomas mediado por ácido abscísico (ABA) (Zhang *et al.*, 2001; Desikan *et al.*, 2003). Además, se ha observado que el H₂O₂ induce la activación de canales de calcio y puede relacionarse con el incremento en las concentraciones citosólicas del mismo en células de guarda intactas (Pei *et al.*, 2000). De esta manera, las ERO y la activación de canales de calcio pueden representar un eslabón de señalización común a muchas respuestas de plantas, implicándose específicamente a la explosión oxidativa en la activación del flujo de calcio (Levine *et al.*, 1996). Las ERO también tienen un papel importante en la inducción de la producción de lignina (Olson y Varner, 1993) y en la acumulación de fitoalexinas (Degousse *et al.*, 1994). Por otro lado, el daño a los lípidos de membrana inducido por ERO está relacionado con la pérdida de la integridad membranal y la subsecuente muerte celular (Adam *et al.*, 1989).

Se han sugerido dos mecanismos diferentes para la generación de ERO durante las reacciones de resistencia ante el ataque de patógenos en plantas, el primero de ellos propone que la producción apoplástica de H₂O₂ está mediada por peroxidasas de pared celular dependientes de pH (Bolwell *et al.*, 1995; Bestwick *et al.*, 1997; Bestwick *et al.*, 1999), oxalato oxidasas o amino oxidasas (Apel y Kirt, 2004; Mittler *et al.*, 2004). El segundo mecanismo de producción de ERO sugiere la generación de superóxido catalizada por una NADPH oxidasa (Rboh) unida a la membrana plasmática, similar a la responsable de la explosión oxidativa en neutrófilos de mamíferos; esto se basa en las similitudes entre la explosión oxidativa plantas con la de mamíferos, es decir: el radical superóxido es la especie primaria detectada en la mayoría de los sistemas vegetales estudiados (Doke, 1983; Auh y Murphy, 1995; Murphy y Auh, 1996; Jabs *et al.*, 1997;

Sagi y Fluhr, 2001); la velocidad de producción de ERO en células elicidadas es similar en mamíferos y plantas (Low y Merida, 1996) y la generación de ERO en plantas puede ser inhibida por DPI, el cual funciona como inhibidor de la NADPH oxidasa de mamíferos y en general de las enzimas que contienen flavina (Jabs *et al.*, 1996; Murphy y Auh, 1996).

8.1 Técnicas de medición de ERO

El desarrollo de metodologías para medir la generación-liberación de los productos de la explosión oxidativa es de gran importancia, por lo que se han utilizado para ello un gran número de técnicas. Idealmente, una técnica diseñada para medir la producción celular de ERO debería ser: a) específica para la ERO particular que se desee estudiar; b) muy sensible; c) no interferir con las funciones celulares; d) distinguir el lugar en donde se generó esta especie; e) no requerir equipo de laboratorio muy caro o difícil de manejar y f) ser fácil de estandarizar, además de ser reproducible. Hasta ahora, ninguna técnica satisface completamente estos criterios (Dahlgren y Karlsson, 1999). Entre las técnicas más usadas para medir la liberación extracelular de ERO se encuentran diferentes ensayos de fluorimetría y quimioluminiscencia (Anderson, *et al.*, 1991; Baker y Orlandi, 1997) que permiten detectar H_2O_2 , y diferentes ensayos por medio de los cuales es posible detectar al radical superóxido, entre éstos se incluyen la resonancia electrónica de espin (Von Goenner *et al.*, 1993), fotometría, luminometría y reacciones de precipitación en las que se forman productos coloridos que pueden ser detectados espectrofotométricamente (Dahlgren y Karlsson, 1999). De éstas últimas, una de las reacciones más usadas es la reducción de sales de tetrazolio que son compuestos cuaternarios de amonio cuyos productos de reducción son muy coloridos y en general se conocen como formazán. Los colorantes de tetrazolio más comúnmente usados son el NBT, el XTT y el MTS (Sutherland y Learmonth, 1997; Able *et al.*, 1998). El producto de la reducción de NBT, el diformazán, es un compuesto poco soluble de color azul, lo cual resulta útil para la localización de la generación de radicales (principalmente radical superóxido) en tejidos (Sutherland y Learmonth, 1997), aunque también ha sido usado para determinar la producción del mismo en geles de poliacrilamida (Sagi y Fluhr, 2001). Los colorantes de monotetrazolio XTT y MTS generan un formazán cargado y soluble en agua cuando son reducidos y tienen además un pico de absorbancia intenso en el intervalo visible del espectro, por lo que resultan muy convenientes para determinar la presencia del radical superóxido en disolución (Sutherland y Learmonth, 1997).

En este trabajo se utilizó la reducción de los colorantes de tetrazolio NBT y XTT debida a proteínas de fracciones membranales de embriones de *Z. mays* a fin de determinar en esta especie la producción del radical superóxido catalizada probablemente por una NADPH oxidasa de membrana plasmática similar a la de los neutrófilos de mamíferos. Los resultados obtenidos

indican que se llevó a cabo la reducción de estos compuestos, sugiriendo la producción de este radical. Se encontró que a tiempos largos, la sensibilidad del XTT fue de hasta seis veces la del NBT (figura 9A), sin embargo, el diformazán generado por este último es una molécula de mayor tamaño y con menor solubilidad que el monoformazán formado por la reducción del XTT, por lo que resulta un compuesto más apropiado para la determinación de la producción del radical catalizada por proteínas separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida, por esta razón no se descartó el uso de este colorante en posteriores ensayos en disolución.

Se encontró además que la reacción de reducción de NBT es dependiente tanto de la concentración de proteína (figura 9B) como del sustrato (figura 10A), esta última presentó una cinética del tipo Michaeliano con valores de $K_M = 35 \mu\text{M}$ y $V_{\text{max}} = 0.2739$ (figura 10B).

Los genes *Rboh* de células vegetales tienen una extensión en el extremo amino terminal, presumiblemente citosólica, que puede ser mayor a 200 aminoácidos con dos motivos de unión a Ca^{2+} (EF-hand motifs) (Keller *et al.*, 1998), lo que puede indicar la regulación directa por Ca^{2+} en estas oxidasas. Esto es relevante en varios contextos funcionales, en los cuales la señalización por Ca^{2+} precede a la producción de ERO. Este dominio está ausente en la subunidad gp91^{phox} de células de mamíferos, pero está presente en otros homólogos de la NADPH oxidasa, por ejemplo en la NADPH oxidasa 5 (NOX5) y en las oxidasas duales 1 y 2 (DUOX1 y DUOX2) de humanos, las cuales contienen cuatro sitios de unión a calcio en el lado del extremo amino terminal y presentan una producción de superóxido dependiente de calcio ($\approx 75 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} en el caso de NOX5) (Banfi *et al.*, 2001). En nuestro sistema de estudio, la reacción de reducción de NBT y XTT por fracciones de membrana plasmática de embriones de maíz mostró una ligera dependencia de la concentración del catión añadido al compararse con el control (figura 11). Es importante considerar que debido a las contaminaciones comunes de los reactivos por Ca^{2+} , las disoluciones contenían alrededor de $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre por lo cual el control mismo ya contenía al catión, esto se confirmó cuando los ensayos se realizaron en presencia de un quelante como EDTA o EGTA, en los cuales se observó una ligera inhibición en la reducción de NBT.

Los datos disponibles sugieren que la afinidad de *Rboh* por el catión es baja, ya que sus efectos máximos se han establecido a concentraciones mayores a 2 mM (Keller *et al.*, 1998; Sagi y Fluhr, 2001). En nuestro caso, la pobre estimulación por Ca^{2+} ($12.16 \pm 6.13\%$) podría deberse a una ausencia de la región que une al catión y que ha sido localizada hacia el extremo N-terminal. Como posteriormente se mostró en el ensayo de actividad en gel, es posible que la proteína que contribuye principalmente a la reducción de los colorantes de tetrazolio sea un fragmento producido por proteólisis de la enzima.

8.2 Inhibidores de la reducción de los colorantes de tetrazolio

La explosión oxidativa catalizada por la NADPH oxidasa de neutrófilos puede ser inhibida por DPI en concentraciones de 0.1-10 μM (Ellis *et al.*, 1988). Concentraciones 10 veces mayores (1-100 μM) han sido necesarias para inhibir la explosión oxidativa de cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis* (Desikan, *et al.*, 1996), frijol (Levine *et al.*, 1994; Dwyer *et al.*, 1996 y Mithöfer *et al.*, 1997), garbanzo (Otte y Barz, 1996) y rosa (Murphy y Auh, 1996); así como en hojas de *Arabidopsis* (Auh y Murphy, 1995; Desikan *et al.*, 1996; Dwyer *et al.*, 1996; Levine *et al.*, 1994; Otte y Barz, 1996; Mithöfer *et al.*, 1997). Esto ha sido usado como evidencia de que un homólogo de la NADPH oxidasa de mamíferos está presente en la membrana plasmática de las células vegetales y puede ser responsable de la explosión oxidativa inducida por patógenos o elicitores químicos. Esta idea ha sido soportada por el descubrimiento de que aparentemente el DPI no inhibe la actividad de peroxidasas en un estudio estándar de la reacción (oxidación de un sustrato fenólico por H_2O_2), excluyéndolas de esta manera como intermediarios de la producción de ERO inhibible por DPI en células vegetales (Mithöfer *et al.*, 1997; Otte y Barz, 1996; Auh y Murphy, 1995). Sin embargo, Frahy y Schopfer (1997) demostraron que la actividad reductora del O_2 por una peroxidasa para dar H_2O_2 y superóxido en presencia de NADH puede ser inhibida fuertemente por DPI, por lo que el uso de este compuesto no proporciona una evidencia concluyente de que la producción del radical superóxido en células vegetales evocadas es debida a una NADPH oxidasa. En general, la especificidad de los compuestos de iodonio, incluyendo al cloruro de difenilén iodonio (DPI) para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa es actualmente materia de debate (Barceló y Ferrer, 1999). Los compuestos de iodonio son capaces de inhibir a una gran variedad de flavoproteínas, incluyendo a la NADH deshidrogenasa mitocondrial (Doussiere y Vignais, 1992), la nicotinamida adenina oxidasa bacteriana (Brandsch y Bicher, 1987), la NO sintasa de macrófagos (Stuehr *et al.*, 1991) y la xantina oxidasa (Doussiere y Vignais, 1992), así como de interactuar con hemoproteínas, tales como el citocromo P-450 (Battioni *et al.*, 1988) y el citocromo b_{558} de neutrófilos (Deme *et al.*, 1994). Sin embargo, sí puede considerarse un criterio acertado para inferir que una actividad de oxidación de NADPH inhibible por DPI corresponde a una enzima con una flavina como grupo prostético. En las NADPH oxidasas membranales reportadas tanto de mamíferos, hongos y plantas, éste parece ser el caso.

Por otra parte, la enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de los radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular ($2\cdot\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$) (McCord y Fridovich, 1969), por lo que actúa como una enzima antioxidante que previene el daño oxidativo a los tejidos causado por el radical superóxido y sus derivados. Se ha observado que la adición de SOD al medio de reacción inhibe la reducción de MTS y XTT

en un sistema acoplado de xantina/xantina oxidasa de manera dependiente de la concentración, de tal manera que la reducción del colorante puede ser completamente inhibida. En contraste con esto, la SOD fue incapaz de inhibir totalmente la reducción de NBT (Sutherland y Learmonth, 1997). La SOD inactivada no tuvo ningún efecto en la reducción de los colorantes (Sutherland y Learmonth, 1997; Able *et al.*, 1998).

En concordancia con lo anterior, en nuestro sistema de estudio, la reducción de los colorantes NBT y XTT pudo ser inhibida en diferentes porcentajes por DPI y SOD (figura 12). En el caso de NBT, la mayor inhibición en la reacción debida a proteínas de membrana plasmática estuvo dada por DPI, mientras que para la reducción de XTT la mayor inhibición fue ocasionada por la incubación de las vesículas membranales con SOD. No encontramos una explicación para la discrepancia entre los valores de inhibición de la reducción de los dos colorantes con respecto a ambos inhibidores. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que en una gran proporción, la actividad medida en disolución es debida a una flavoproteína reductora de O₂ como la NADPH oxidasa.

El radical superóxido también puede producirse en células vegetales durante el metabolismo aerobio normal, debido a estrés ambiental o senescencia y sus fuentes metabólicas incluyen cloroplastos y mitocondrias (Mach y Greenberg, 2004). En nuestro sistema de estudio podemos descartar como fuente del radical superóxido detectado a los cloroplastos, dado que los experimentos se llevaron a cabo usando fracciones membranales de embriones de maíz en estadios de desarrollo en los que se puede asumir que aún no hay fotosíntesis y por lo tanto la contaminación por membranas de cloroplasto es prácticamente nula. Los ensayos de reducción de NBT en presencia de rotenona y NaN₃, en los cuales no se detectó inhibición de la reacción (figura13), demostraron que la contribución a la reducción del colorante por enzimas mitocondriales también es despreciable, puesto que la rotenona y la azida de sodio son inhibidores de las enzimas NADH deshidrogenasa y citocromo oxidasa, respectivamente, estas enzimas presentes en la mitocondria podrían catalizar la formación de radicales capaces de reducir al colorante.

La contaminación por otras membranas celulares en las vesículas de membranas utilizadas en este trabajo fue baja, encontrándose un enriquecimiento de tres veces en los marcadores de la membrana plasmática (la ATPasa de H⁺ y la glucan sintetasa II) con respecto a la fracción microsomal (Carmona, 2006).

8.3 Efecto de los compuestos esfingoideos en la formación del radical superóxido medida en disolución

Las fumonisinas (FB) son un grupo de micotoxinas producidas principalmente por *Fusarium verticillioides*, un patógeno natural del maíz y otros cereales, que producen diferentes efectos tóxicos en animales y humanos, siendo la FB₁ la más potente y abundante.

Stockmann-Juvala *et al.*, (2004) caracterizaron parámetros relacionados con estrés oxidativo inducido por FB₁ en tres diferentes líneas de células neurales de humano, rata y ratón, las cuales fueron expuestas a FB₁ en dosis de entre 0.1 y 100 μM durante intervalos de 0 a 144 h, después de lo cual la producción de ERO, peroxidación de lípidos, niveles intracelulares de GSH (glutatiión reducido) y la viabilidad celular fueron determinados. En las líneas neurales de rata y ratón, la FB₁ causó un incremento en la producción de ERO dependiente de la dosis, pero no tuvo efecto en la de humano. Se observaron un decremento de los niveles de GSH y un incremento en la formación de malondialdehído (MDA), como indicador de la peroxidación de lípidos, así como muerte celular por necrosis en todas las líneas celulares después de la incubación con FB₁. Estos resultados indican que la FB₁ induce estrés oxidativo en cultivos de células neurales de éstas especies (Stockmann-Juvala *et al.*, 2004), así como en membranas modelo y en membranas de células de riñón de mono. En plantas, la FB₁ promueve la formación de ERO medida como H₂O₂ en *Arabidopsis thaliana*, lo cual se correlacionó con la expresión de una lesión en la hoja parecida a la HR (Asai *et al.*, 2000), lo cual sugiere que la toxina está desencadenando respuestas del tipo de defensa. De igual manera, los estudios previos realizados en nuestro laboratorio con la toxina han mostrado que ésta promueve varias respuestas características de defensa en embriones de maíz durante la germinación, tales como el aumento en la síntesis de RNA_m de proteínas de defensa (SanJuan *et al.*, 2001), el aumento en la degradación de DNA (De la Torre *et al.*, 2003) y el incremento en la producción de ácido salicílico (Rivas *et al.*, 2003).

Aunado a lo anterior, en este trabajo se encontró que la reducción de NBT y XTT por vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz embebidos 24 h en 20 μM de FB₁ se incrementó entre un 50 y un 35% con respecto al control (figura14). Cuando los embriones fueron expuestos *in vivo* a FB₁ 10 μM se observó una disminución en la reducción de los compuestos de tetrazolio, con respecto al control (figura 15).

En experimentos preliminares realizados en el laboratorio no se había detectado FB₁ en membranas plasmáticas de embriones de maíz incubados en presencia de 10 μM de FB₁ durante 24 h; sin embargo, cuando los embriones se incubaron durante el mismo tiempo en presencia de 20 μM de este compuesto, la cantidad de la toxina detectada fue de aproximadamente 0.34 pmolas por mg de proteína membranal de la muestra (Gutiérrez-Nájera, no publicado); en las

condiciones usadas en nuestro sistema experimental, la cantidad de la toxina presente equivale a 0.01 pmolas del compuesto en las vesículas usadas en cada celda. Éstos datos podrían sugerir que la FB₁ remanente en la membrana plasmática (si bien en muy bajas concentraciones), podría estar causando una reacción de explosión oxidativa en los embriones expuestos al compuesto. Por otra parte, se ha propuesto que el mecanismo de toxicidad de la FB₁ está relacionado con la similitud estructural entre la FB₁ y la esfinganina (Wang *et al.*, 1990; Merrill *et al.*, 2001), causando la interrupción del metabolismo de los esfingolípidos. La FB₁ es un inhibidor competitivo con respecto a la esfinganina y el ácido graso acil coenzima A, sustratos de la esfinganina-*N*-aciltransferasa, una enzima clave en la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos. En el modelo, el esqueleto de aminopentol de la FB₁ compite con el sustrato (base esfingoidea) en el sitio catalítico de la enzima, mientras que los ácidos tricarbálicos interfieren con el enlace del ácido graso de la acil- CoA al sitio catalítico, lo que lleva a un bloqueo en la biosíntesis de los esfingolípidos complejos y a la acumulación de esfinganina. En plantas, se ha observado que la adición de FB₁ a *Lemna pausicostata* Heglem. 6746, plantas de tomate y callo de tabaco, causa una marcada elevación de fitoesfingosina y esfinganina, las cuales normalmente están presentes en bajas concentraciones (Abbas *et al.*, 1994). Acorde a lo anterior, en nuestro laboratorio se había detectado un aumento de aproximadamente siete veces en el nivel de SN presente en la membrana plasmática de embriones de maíz expuestos a FB₁ en concentraciones de 10 μM durante 24 h, y de casi ocho veces en el contenido de PS detectada en fracción microsomal. Estos datos también podrían indicar que el exceso de estas bases esfingoideas, en particular de la SN podría ser el responsable del incremento en la producción del radical superóxido observado en nuestro sistema. Sin embargo, el aumento de SN en la membrana plasmática se esperaría, tanto en vesículas de membrana plasmática de los embriones expuestos *in vivo* a 10 μM de FB₁ como en las obtenidas de aquellos expuestos a 20 μM de la toxina, (sólo se determinó experimentalmente a 10 μM de FB₁). El efecto de la toxina en la producción de ERO sólo se observó cuando la concentración empleada fue 20 μM, lo que no nos permite aclarar la participación de la SN en el mismo.

Por lo anterior, los embriones fueron expuestos *in vivo* a SN 20 μM, durante 24 h (figura 14). La reducción de NBT o XTT por vesículas de membrana plasmática obtenidas de estos embriones se vió incrementada hasta en un $83.18 \pm 6.05\%$ con respecto al control; sin embargo, no se encontró diferencia significativa en la producción del radical superóxido respecto del control en membranas plasmáticas de los embriones que fueron expuestos *in vivo* a 20 μM de PS. En ensayos preliminares cuyos resultados no se muestran aquí, no se había encontrado diferencia en la reducción de NBT debida a membranas plasmáticas obtenidas de embriones embebidos

durante 24 h en 20 μM de ceramida. No se encontró diferencia en la reducción de NBT o XTT cuando los embriones fueron expuestos *in vivo* a SN 10 μM durante 24 h (figura 15).

Para comprobar si alguno de estos compuestos (FB_1 o SN) podía estimular directamente la producción de superóxido, se realizaron ensayos de reducción de NBT utilizando vesículas membranales de embriones embebidos en medio control y preincubadas en presencia de éstos compuestos en las cantidades en que presumiblemente estarían enriquecidas las membranas plasmáticas de los embriones expuestos a ellas durante 24 h con una concentración en el medio de imbibición de 20 μM . A diferencia de los resultados obtenidos cuando se utilizaron membranas plasmáticas de embriones expuesto a los compuestos *in vivo*, en los cuales se observó estimulación de la reacción, la reducción de NBT por membranas obtenidas a partir de embriones que fueron embebidos en medio control y que fueron expuestas a FB_1 o SN *in vitro* se vió inhibida hasta en un $95.4 \pm 1.1\%$ (figura 16). La exposición *in vitro* a PS también causó inhibición en la reacción (resultados no mostrados). Se sabe que la NADPH oxidasa de mamíferos se encuentra en balsas lipídicas enriquecidas en esfingolípidos y colesterol y depende de estos microdominos para su activación (Shao, Segal y Dekker, 2003; Vilhardt y van Deurs, 2004). En plantas de tabaco se encontró que esta enzima es reclutada a estas estructuras después de la estimulación por criptogéina, así como la presencia de NtRac5, una pequeña proteína G que actúa como regulador negativo de la enzima (Mongrand *et al.*, 2004). En nuestro caso, es posible que el entorno lipídico natural en el que se encuentra inmersa la enzima en las membranas control sea suficiente para promover su estado activado y el exceso de esfingolípidos agregados podría estar ejerciendo otros efectos que alteren la actividad de la enzima, como es la disminución de fluidez (Gutiérrez-Nájera *et al.* 2005). Adicionalmente, es muy probable que la SN y PS exógenas sigan distintas vías de incorporación a la membrana de las que siguen las endógenas. Éstas podrían ser explicaciones alternativas a la discordancia en los resultados de los efectos de compuestos esfingoideos obtenidos por la exposición *in vivo* e *in vitro* de los embriones de maíz.

Otra consecuencia derivada de la exposición de los embriones a medios con exceso de SN, es que se podría estar estimulando la síntesis de ceramida y esfingolípidos complejos, con lo que éstos también se convierten en candidatos responsables del incremento en la producción de ERO. Sin embargo esto es improbable, ya que tanto a 10 como a 20 μM de FB_1 añadida *in vivo* se tendrían bajos niveles de esfingolípidos complejos, por lo cual en ambos casos se esperaría la misma tendencia en la producción de ERO, en el primer caso, la reducción de los colorantes de tetrazolio se estimula y en el otro no. Por otra parte, al añadir 10 y 20 μM de SN *in vivo*, se esperaría tener altos niveles de esfingolípidos complejos, quizás más altos a la concentración mayor de SN, sin embargo, la producción de ERO aumenta en el último caso, mientras que en el

Cuando se realizaron ensayos de reducción de NBT añadiendo ceramida o glucosilceramida *in vitro* a vesículas de membranas de embriones de maíz embebidos en medio control se observó una inhibición menor a la observada por la exposición en las mismas condiciones a FB₁ o SN, sobre todo cuando el compuesto añadido fue glucosilceramida, estos resultados son preliminares por lo que no se presentan aquí. Lo anterior indica que no hay una correlación entre los niveles de esfingolípidos complejos y la producción de superóxido; sin embargo, para aclarar esta parte, es necesario verificar las condiciones membranales en cada condición experimental: niveles de SN, de FB₁, de fluidez membranal y de esfingolípidos complejos.

8.4 Efecto de los diferentes tipos de exposición a los compuestos esfingoideos en la formación del radical superóxido medida en disolución

Se sabe que la aparición de ERO durante la explosión oxidativa usualmente es muy rápida y puede variar dependiendo del sistema vegetal estudiado y del factor estimulante. En cultivos de células en suspensión, esta respuesta frecuentemente inicia de 1 a 2 min después de la adición al medio de elicitores fúngicos u oligo-1,4- α -D-galacturonidos (OGA) derivados de la planta, alcanza su máximo pocos minutos después y es completada dentro de los 15 a 20 min posteriores a la estimulación (figura 26A). Cuando se usaron tejidos de plantas completas, la explosión oxidativa fue observada a un tiempo más largo, presentándose una respuesta bifásica en respuesta al tratamiento bacteriano, en la cual la primera fase de la explosión oxidativa ocurre a los pocos minutos posteriores a la estimulación y es transitoria, mientras que la segunda fase es más intensa y prolongada que la primera (figura 26B); en plantas tratadas con fragmentos de OGA la producción de ERO se observó aproximadamente a las 3 h posteriores a la inoculación pero su intensidad fue alta y sostenida (Wojtaszek, 1997).

Con objeto de estudiar la temporalidad de la explosión oxidativa detectada en los embriones de maíz, se les sometió a imbibición durante diferentes tiempos (3, 6 ó 12 h) en presencia o ausencia de FB₁ 20 μ M (la concentración a la que se había detectado un aumento en la producción del radical superóxido). En estas condiciones de exposición de los embriones a FB₁ no se observaron diferencias significativas en la reducción de NBT o XTT por las fracciones microsomales de los mismos (figura 17). Estos resultados podrían explicarse por varios fenómenos que ocurren simultáneamente. Por un lado, los embriones están atravesando un programa de desarrollo que se inicia desde la hidratación del tejido y al que sobrevienen etapas de reactivación diferencial del metabolismo, por lo cual, el fondo metabólico no es constante. Por otra parte, tanto la toxina como los compuestos esfingoideos están permeando al embrión con una cinética específica y están siendo metabolizados según la capacidad del embrión, dificultándose así el análisis del efecto de los compuestos en un entorno cambiante.

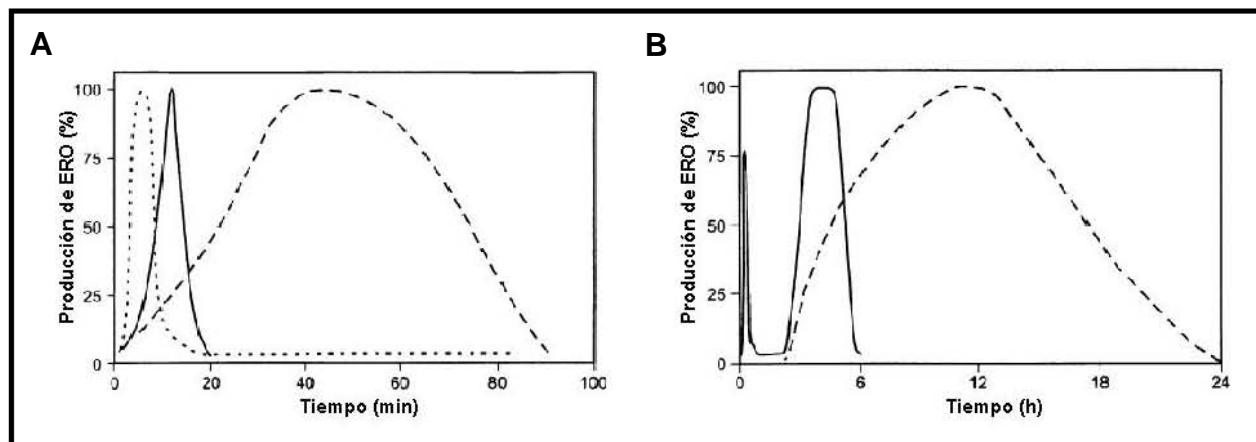


Figura 26. Representación esquemática de la cinética de la explosión oxidativa en cultivos de células en suspensión o plantas posterior al tratamiento con varios tipos de moléculas elicitoras. (A) Respuestas de células en suspensión por elicitores fúngicos (—) o fragmentos de oligaracturónidos (OGA) derivados de la planta (....) comparados con la respuesta de plantas preconicionadas a elicitores fúngicos (--). (B) Reacción bifásica de células de plantas a la elicitación bacteriana (—) y generación de ERO por plantas en respuesta al tratamiento con OGA (- -) (Wojtaszek, 1997).

Adicionalmente, el utilizar microsomas implica la presencia de otras membranas cuyas enzimas podrían contribuir a la reducción de los colorantes de tetrazolio y sobre los cuales los compuestos esfingoides podrían o no tener un efecto, enmascarando los debidos a las enzimas correspondientes a membrana plasmática. Por esta razón se modificó del esquema de exposición de los embriones a los compuestos esfingoides, sometiéndolos a una imbibición continua por 2 2 h, tiempo en el que ya está avanzado el programa de germinación y a partir del cual se expusieron durante tiempos adicionales (3, 6 ó 12 h) en medios que contenían 20 μM de FB_1 , SN o PS. De esta manera también se favorecía el estudio de la producción del superóxido a tiempos cortos, que son los reportados para la activación de NADPH oxidasa. Se encontró que las fracciones microsomales de embriones que fueron sometidos a este tratamiento mostraron un incremento en la producción de radical superóxido medida por reducción de NBT cuando fueron embebidos 3 h en tales compuestos, encontrándose una gran estimulación por FB_1 y por SN, además, se observó que en estas condiciones de exposición, la PS también tuvo un efecto de estimulación de la producción del radical superóxido. Cuando el colorante empleado para la detección del radical fue XTT, también se observó un incremento en la producción del mismo, sin embargo, el porcentaje de aumento fue mucho menor que en los experimentos con NBT (figura 18); puesto que los experimentos se realizaron usando las mismas fracciones membranales, no sabemos si estas

diferencias fueron debidas a los colorantes. Cuando los embriones fueron embebidos en presencia de los compuestos esfingoideos durante 6 ó 12 h, no se observaron diferencias significativas con respecto al control, ni en los experimentos realizados con NBT ni en los que se empleó XTT.

Respecto a la temporalidad de la explosión oxidativa presentada por embriones de maíz expuestos tanto a FB₁ como a SN y PS en concentraciones de 20 μM, con los resultados obtenidos en este trabajo se puede afirmar que existe un incremento en la producción del radical superóxido a las 3 h de exposición al compuesto. Sin embargo, la carencia de mediciones a tiempos mucho más cortos, impide afirmar si esta activación de 3 h corresponde a una segunda fase de un patrón bifásico de explosión oxidativa o a una sección de un patrón monofásico. Por lo tanto, quedaría pendiente estudiar el sistema utilizando tiempos de exposición menores.

La discordancia entre los porcentajes de inhibición o incremento en la producción del radical superóxido debido a fracciones membranales de embriones de maíz embebidos en presencia de compuestos esfingoideos medida por la reducción de NBT o XTT se observó en todos los experimentos realizados. Sin embargo, a pesar de las diferencias en los resultados obtenidos en estos experimentos cabe destacar que la tendencia observada en los resultados es la misma, por lo que podemos afirmar con seguridad, que tanto la exposición *in vivo* a FB₁ como a SN aumentan la producción del radical superóxido en embriones de maíz y que este efecto es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición al compuesto; en el caso de la FB₁, bajas concentraciones de la toxina (10 μM) inhiben la reacción, mientras que concentraciones altas (20 μM) la estimulan, este último efecto también se aplica a SN. Además, se observó que la exposición a PS 20 μM durante tiempos cortos también produjo un aumento en la producción del radical superóxido, aunque este aumento fue ligeramente menor al provocado por FB₁ o SN.

El efecto de estimulación de la actividad de NADPH oxidasa de células vegetales por FB₁ y SN se suma a otras reacciones inducidas por compuestos esfingoideos encontradas previamente en el laboratorio y que están relacionadas con los mecanismos de defensa contra patógenos presentados por una planta.

8.5 Efecto de los compuestos esfingoideos en la formación del radical superóxido. Ensayo en gel

En el ensayo en gel, se detectó consistentemente una banda principal de proteína que catalizaba la reducción de NBT dependiente de NADPH con una masa molecular aparente de 63 kDa (figura 19). Además, durante incubaciones prolongadas con el colorante se detectaron bandas de proteína de menor peso molecular (≈35 kDa) en los geles, las cuales podrían corresponder a productos de degradación de la enzima que conservan su actividad o bien a otras

enzimas capaces de reducir al NBT. No se observó ninguna banda de actividad cuando se adicionó al medio de incubación de los geles DPI o SOD (figura 20), en ausencia de NADPH o cuando el sustrato usado fue NADH, lo que sugiere que las bandas de formazán detectadas en los geles fueron originadas por la reducción de NBT dependiente de NADPH y debida a radicales superóxido, como resultado de la actividad de una enzima que contiene flavina.

Se observaron ligeras diferencias en la intensidad de las bandas de formazán debidas al tipo de preparación membranal (microsomas o membrana plasmática), siendo más intensas las bandas correspondientes a proteínas de membrana plasmática, lo que sugiere un enriquecimiento en estas muestras de las proteínas con actividad de NADPH oxidasa, una enzima que se localiza típicamente en la membrana plasmática.

Cuando se emplearon proteínas de membrana plasmática o microsomas de hojas de tabaco o frijol se detectaron, en el primer caso, dos bandas principales de actividad de aproximadamente 120 kDa y 60-70 kDa. En el caso de frijol se observaron dos bandas de actividad de aproximadamente 72 y 62 kDa respectivamente (datos no mostrados).

Sagi y Fluhr (2001) reportaron la detección de una única banda de migración con actividad de NADPH oxidasa en muestras de tomate y dos bandas en tabaco cuando fueron sometidas a separación electroforética en geles nativos. Cuando la separación se efectuó bajo condiciones desnaturizantes detectaron bandas con pesos moleculares de 106, 103 y 75 a 80 kDa. El tamaño del polipéptido putativo de gp91^{phox} en *Arabidopsis* y tomate se ha predicho en un intervalo de pesos moleculares de 94 a 112 kDa (Keller *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1998; Amicucci *et al.*, 1999). La variabilidad en el tamaño de las proteínas detectadas en nuestros geles con respecto a las reportadas en la literatura y al tamaño predicho para los homólogos vegetales de la NADPH oxidasa podría ser resultado de “variantes de corte y empalme”, surgir de procesos proteolíticos específicos postranscripcionales o deberse a procesos proteolíticos inespecíficos durante la obtención de las fracciones membranales o durante el experimento. En cualquier caso, un polipéptido con masa molecular aparente de aproximadamente 65 kDa que haya sido truncado en el extremo amino terminal podría retener el sitio catalítico de enzima y conservar su actividad enzimática. Por otra parte, los ensayos se realizaron usando geles preparados por la técnica de Shägger y von Jagow (1987), mientras que los resultados reportados por Sagi y Fluhr (2001) fueron obtenidos a partir de geles de Laemmli. El corrimiento de las proteínas podría presentar ligeras variaciones de un sistema a otro que afectaran la determinación de su masa aparente. En un ensayo de actividad realizado en un gel de Laemmli cuyos resultados no se presentan aquí, se obtuvo un peso molecular aproximado de 67 kDa para la principal banda de proteína con actividad de NADPH oxidasa detectada en microsomas obtenidos de embriones de maíz. Ni la exposición

de los embriones a FB₁ o los compuestos esfingoideos SN o PS (figura 21), ni el tiempo de exposición a los mismos (resultados no mostrados) afectó la intensidad de las bandas de actividad detectadas en el gel, a pesar de que en el ensayo en disolución la reducción de NBT debida a membranas plasmáticas de embriones de maíz embebidos en estos compuestos resultó ser mayor hasta en un 106 y 104%, como en el caso de las muestras de embriones embebidos durante 22 h en medio control y transferidos 3 h adicionales a medios que contenían FB₁ y SN 20 μ M respectivamente. Sin embargo, se observó difusión del diformazán generado durante la reacción a la disolución de incubación de los geles, lo que podría sugerir una saturación del mismo dentro del gel, razón por la cual no es posible observar diferencias cuantitativas en la reducción del NBT en el gel que reflejen las diferencias del ensayo en solución por las proteínas de los embriones embebidos en los compuestos.

8.6 Inmunodetección de bandas reactivas a un anticuerpo diseñado contra una secuencia de aminoácidos conservada de la NADPH oxidasa de células vegetales

La banda de proteína de \approx 63 kDa con actividad de NADPH oxidasa detectada en membranas de embriones de maíz pudo ser reconocida por un anticuerpo diseñado contra un fragmento de aminoácidos ubicado en la porción del extremo carboxilo terminal de varias NADPH oxidasas de plantas (figura 25). Este anticuerpo constituyó una herramienta confiable para la detección de la NADPH oxidasa, puesto que reconoce a una secuencia muy conservada en al menos 39 secuencias de aminoácidos de 8 diferentes especies vegetales con relaciones filogenéticas de cercanía variable como *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, etc., incluyendo una EST de *Z. mays*. Lo anterior pudo corroborarse en microsomas de hojas de frijol y de tabaco, donde el anticuerpo reconoció principalmente una banda que también presenta actividad de NADPH oxidasa y con una masa molecular aparente de entre 62 y 72 kDa. La detección de la enzima en microsomas de maíz fue más complicada, puesto que el anticuerpo reconoció bandas con diferentes pesos moleculares. Una forma de asegurar que el anticuerpo efectivamente es específico contra NADPH oxidasa sería diseñar oligonucleótidos cebadores contra la secuencia codificante del péptido contra el que se obtuvieron los anticuerpos, aislar el cDNA respectivo, clonarlo y sobreexpresar la enzima en *E. coli* para luego hacer una inmunoréplica.

A la fecha no se han reportado homólogos para esta enzima o sus subunidades en *Z. mays*, sin embargo, el haber encontrado una EST (CK849936 sequence tag) perteneciente a esta especie como parte de una NADPH oxidasa putativa reportada en un banco de datos (<http://www.maizegdb.org/>) y los resultados obtenidos en este trabajo, nos permiten sugerir que un

homólogo de esta enzima con una masa de ≈ 63 kDa puede ser el responsable de la reducción de colorantes de tetrazolio por fracciones membranales de maíz.

La figura 27 representa el modelo propuesto para la producción de ERO por una NADPH oxidasa en embriones de maíz expuestos *in vivo* a FB₁ o SN a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, con base en estos datos no es posible elucidar el mecanismo de activación de la enzima, el cual, junto con la relación entre la actividad de la misma, los esfingolípidos y la respuesta a patógenos pueden ser el tema de futuros trabajos.

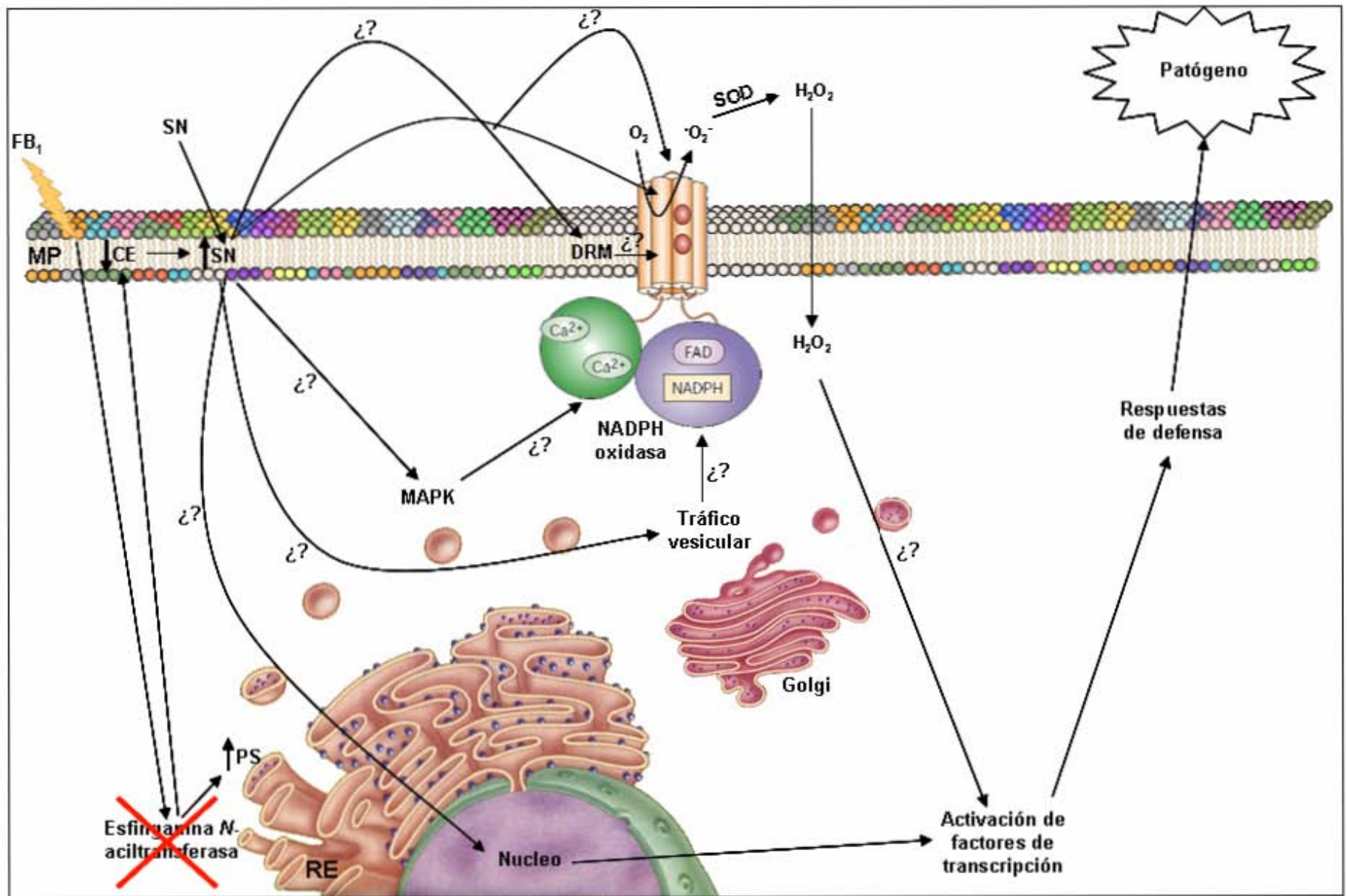


Figura 27. Modelo propuesto para la activación de la NADPH oxidasa de embriones de *Zea mays* expuestos *in vivo* a FB₁ y SN.

9. CONCLUSIONES PARTICULARES

El ensayo en reducción de colorantes de tetrazolio por proteínas de vesículas membranales en disolución acoplado al uso de inhibidores específicos nos permitió detectar la producción de radicales superóxido por una oxidasa de membrana plasmática que contiene como grupo prostético a la flavina, cuya actividad es dependiente de la concentración del sustrato y que puede ser estimulada por calcio. Este ensayo es muy sensible y fue posible detectar la estimulación de la reacción por la exposición *in vivo* de los embriones de *Zea mays* a FB₁ o a los compuestos esfingoideos SN y PS, dependiendo de la concentración o tiempo de exposición a los mismos.

El peso molecular de la enzima o las enzimas responsables de la reducción de los colorantes de tetrazolio se pudo determinar por el ensayo en gel, sin embargo la sensibilidad de este ensayo no permite detectar cambios en temporalidad o intensidad de la explosión oxidativa.

Esta enzima pudo identificarse como un homólogo de la NADPH oxidasa mediante el uso de un anticuerpo diseñado para reconocer una secuencia conservada de aminoácidos localizada en el extremo carboxilo terminal de al menos 39 secuencias de aminoácidos de 8 diferentes especies vegetales con relaciones filogenéticas de cercanía variable.

El efecto de estimulación de la NADPH oxidasa por exposición *in vivo* de los embriones de maíz a FB₁, SN o PS se suma a las otras reacciones inducidas por compuestos esfingoideos que están relacionadas con los mecanismos de defensa contra patógenos, como el aumento en la síntesis de RNA_m de proteínas de defensa (SanJuan *et al.*, 2001), el aumento en la degradación de DNA (De la Torre *et al.*, 2003) y el incremento en la producción de ácido salicílico (Rivas *et al.*, 2003).

10. CONCLUSIÓN GENERAL

La adición de FB₁ y de esfinganina a embriones de maíz es capaz de estimular la formación del radical superóxido por una proteína de la membrana plasmática que tiene las características de una NADPH oxidasa, en condiciones experimentales en las que los embriones expresan respuestas de defensa contra patógenos.

1. Establecer la relación entre la actividad de la NADPH oxidasa, los compuestos esfingoideos y el ataque de un patógeno utilizando células en suspensión y midiendo la producción de ERO utilizando técnicas alternativas.
2. Establecer la relación entre la actividad de la NADPH oxidasa y las cascadas de señalización por MAP cinasas presentadas por células vegetales ante el ataque de patógenos, por ser éstas, elementos de respuestas tempranas.
3. Estudiar la relación entre las actividades de la NADPH oxidasa de células vegetales, las ATPasas de H^+ y los flujos de Ca^{2+} .
4. Determinar la presencia de la NADPH oxidasa en dominios resistentes a detergentes en células vegetales y estudiar su posible función como plataformas de señalización para la activación de la NADPH oxidasa de células vegetales.

1. **Abado-Becogne K, Mobio TA, Ennamany R, Fleurat-Lessard F, Shier WT, Badria F, Creppy EE** (1998) Cytotoxicity of FB₁: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA syntheses. *Arch. Toxicol.* **72**: 233-236.
2. **Abbas HK, Paul RN, Boyette CD, Duke SO, Vesonder RF** (1992) Physiological and ultrastructural effects of fumonisin on jimsonweed leaves. *Can. J. Bot.* **70**: 1824-1833.
3. **Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, Sessions AE, Wnag E, Merrill HA Jr., Riley RT** (1994) Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.* **106**: 1085-1093.
4. **Able AJ, Guest DI, Sutherland MW** (1998) Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *phytophthora parasitica var nicotianae*. *Plant Physiol.* **117**: 491-499.
5. **Adam A, Farkas T, Somlyai G, Hevesi M, Kiraly Z** (1989) Consequence of O₂⁻ generation during a bacterially induced hypersensitive response in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**: 13-26,
6. **Aebersold RH, Teplow DB, Hood LE, Kent SBH** (1986) Electroblotting onto activated glass. *J. Biol. Chem.* **261**: 4229-4238.
7. **Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Suminoto H** (2003). Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 4474-4479.
8. **Agrios GN** (1997) *Plant pathology*, 4^a Edición, Academic Press, EUA, cap. 5. pp 93-114.
9. **Alvarez ME, Penell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell.* **92**: 773-784.
10. **Amicucci E, Gascher K, Ward JM** (1999) NADPH oxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and Curlyleaf pondweed. *Plant Biol* **1**: 524-528.
11. **Anthony RG**, (2004) A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **23**: 572-581.
12. **Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism oxidative stress, and signalling transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373-399.
13. **Apostol I, Heinsteint PF, Low PS** (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* **99**: 109-116.

14. **Asai T, Stone JM, Heard JE, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J, Ausubel FM** (2000) Fumonisin B1-Induced cell death in arabidopsis protoplasts requires jasmonate-ethylene- and Salicylate-Dependent signaling Pathways. *Plant Cell.* **12**: 1823-1835.
15. **Auh C-K, Murphy TM** (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol.* **107**: 1241-1247.
16. **Babior BM** (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**: 1464-1476.
17. **Babior BM, Takeuchi C, Ruedi JM, Gutierrez A, Wentworth P Jr** (2003) Investigating antobpdy-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 3031-3034.
18. **Babior BM** (2004) NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* **16**: 42-47.
19. **Baker CJ, Orlandi EW** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**: 299-321.
20. **Baldrige CW, Gerard RW** (1933) The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol.* **103**: 235.
21. **Banfi B, Molnár G, Maturana A, Steger K, Hegedûs B, Demaurex N, Krause KH** (2001) A Ca^{2+} -activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* **276**: 37594-37601.
22. **Barceló AR, Ferrer MA** (1999) Does diphenylene oidonium chloride have any effect on the O_2^- -generating step of plant peroxidases? *FEBS Lett.* **462**: 254-256.
23. **Beisiegel U** (1986) Protein blotting. *Electrophoresis.* **7**: 1-18.
24. **Bestwick CS, Brown IR, Bennet MHR, Mansfield JW** (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *The Plant Cell.* **9**: 209-221.
25. **Bestwick CS, Bolwell P, Mansfield JW, Nicole M, Wojtaszek P** (1999). Generation of the oxidative burst-scavenging for the truth. *Trends in Plant Sci.* **4**: 88-89.
26. **Bhat RV, Shetty PH, Amruth RP, Sudershan RV** (1997) A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins. *J. Toxicol. – Clin. Toxicol.* **35**: 249-255.
27. **Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef wm, Dinauer MC** (2001) Heme-ligating histidines in flavocytochrome b_{558} : identification of specific histidines in gp91(phox). *J. Biol. Chem.* **276**: 31105-31112.
28. **Bolger M, Coker RD, DiNovi M, Gaylor D, Gelderblom W, Olsen M** (2001) In Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Edited by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Aditives (JECFA). FAO, Rome. 103-280.

29. **Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A** (1995) Origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad. Res.* **23**: 517-532.
30. **Bolwell GP** (1996) The origin of the oxidative burst in plants. *Biochem. Soc. Trans.* **24**:438-441.
31. **Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R** (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: An alternative mechanism for generating death signals. *Cell.* **82**: 405-414.
32. **Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell.* **70**: 21-39.
33. **Briskin DP, Leonard RT, Hodges TK** (1987) Isolation of the plasma membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* **148**: 542-557.
34. **Bucchi TJ, Hansen DK, LaBorde JB** (1996) Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B1. *Natural Toxins.* **4**: 51-52.
35. **Carmona L** (2006) Aislamiento y caracterización de membranas resistentes a detergente (DRM) en diferentes especies vegetales. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM, México.
36. **Casteel SW, Turk JR, Rottinghaus GE** (1994) Chronic effects of a dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine. *Fundamental and Applied Toxicology.* **23**: 518-524.
37. **Chu FS, Li GY** (1994) Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology.* **60**: 847-852.
38. **Ciacci-Zanella JR, Merrill AH Jr, Wang E, Jones C** (1998) Characterization of cell-cycle arrest by fumonisin B₁ in CV-1 Cells. *Food Chem. Toxicol.* **36**: 791-804.
39. **Cortez-Rocha MO, Ramírez-Astudillo WR, Sánchez-Mariñez RI, Rosas-Burgos EC, Wong-Corral FJ, Borboa-Flores J, Castellón-Campaña LG, Tequida-Meneses M** (2003) Fumonisin and fungal species in corn from Sonora, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **70**: 668-673.
40. **Creelman RA, Mullet JE** (1997) Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell.* **9**: 1211-1223.
41. **Cross AR, Rae J, Curnutte JT** (1995) Cytochrome b245 of the neutrophil superoxide-generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91phox. *J. Biol. Chem.* **270**: 17075-17077.
42. **Dahlgren C, Karlsson A** (1999) Respiratory burst in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods.* **232**: 3-14.

43. **Dangl JL y Jones JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*. **411**: 826-833.
44. **Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ** (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*. **324**: 1-18.
45. **DeCoursey TE, Cherny VV, Morgan D, Katz BZ, Dinauer MC** (2001) The gp91phox component of NADPH oxidase is not the voltage-gated proton channel in phagocytes, but it helps. *J. Biol. Chem.* **276**: 36063-36066.
46. **DeCoursey TE** (2003) Interactions between NADPH oxidase and voltage-gated proton channels: why electron transport depends on proton transport. *FEBS Lett.* **555**: 57-61.
47. **De la Torre ME, Rivas SM, Cruz OR, Gavilanes RM y Plascencia J.** Introduction of nuclease expression and activity by disruption of sphingolipid metabolism in germinating maize seeds. 7th International Congress of Plant Molecular Biology. Barcelona, España. Junio 23-28, 2003.
48. **Degousee N, Triantaphylides C, Montillet JL** (2004) Involvement of oxidative processes in the signaling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.* **104**: 945-952.
49. **Del Rio LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P, Corpas FJ** (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Rad. Biol. Med.* **13**: 557-580.
50. **Delledone M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. **394**: 585-588.
51. **Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 13454-13459.
52. **Desai K, Sullards MC, Allegood J, Wang W, Schmelz EM, Hartl M, Humpf HU, Liotta DC, Peng Q, Merrill AH Jr.** (2002) Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1585**: 188-192.
53. **Desikan R, Hancock JT, Coffey MJ, Neil SJ** (1996) Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett.* **33**: 213-217.
54. **Desikan R, Reynolds A, Hancock JT, Neill SJ** (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem. J.* **330**: 115-120.
55. **Desikan R, Cheung M-K, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ** (2003) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* **55**: 205-212.

56. **Doke N** (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplast during the hypersensitive response to hyphal cell wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* **23**: 359-367.
57. **Doussi re J, Vignais PV** (1992) Diphenylene iodonium as an inhibitor of the NADPH oxidase complex of bovine neutrophils. Factors controlling the inhibitory potency of diphenylene iodonium in a cell free system of oxidase activity. *Eur. J. Biochem.* **208**: 61-71.
58. **Drapper J** (1997) Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defense. *Trends. Plant. Sci.* **2**: 162-165.
59. **Dwyer SC, Legendre L, Low PS, Leto TL** (1996) Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins. *Biochim. Et Biophys Acta.* 231-237.
60. **Ecker JR** (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science.* **268**: 667-675.
61. **Felle H** (1998) The apoplastic pH of the *Zea mays* root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: aspects of regulation. *J. Exp. Bot.* **49**: 987-995.
62. **Ferrante MC, Meli R, Raso GM, Esposito E, Severino L, Di Carlo G, Lucisano A** (2002) Effect of fumonisin B₁ on structure and function of macrophage plasma membrane. *Toxicol. Lett.* **129**: 181-187.
63. **Fincham JE, Marasas WF, Taljaard JJ, Kriek NP, Badenhorst CJ, Gelderblom WC** (1992) Atherogenic effects in a non-human primate of *Fusarium moniliforme* cultures added to a carbohydrate diet. *Atherosclerosis.* **94**: 13-25.
64. **Flor HH** (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275-296.
65. **Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Tarres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* **422**: 442-446.
66. **Frahry G, Schopfer P** (1997) Inhibition of O₂-reducing activity of horseradish peroxidase by diphenyleneiodonium. *Phytochemistry.* **48**: 223-227.
67. **Franceschi S, Bidoli E, Baron AE, La Vecchia C** (1990) Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. *J. National Cancer Institute.* **82**: 1407-1411.
68. **Fridovich I** (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* **44**: 147-159.
69. **Fujii H, Finnegan MG, Miki T, Crouse BR, Kakinuma K, Johnson MK** (1995a) Spectroscopic identification of the heme axial ligation of Cytochrome b₅₅₈ in the NADPH oxidase of porcine neutrophils. *FEBS Lett.* **377**: 345-348.

70. **Fujii H, Johnson MK, Finnegan MG, Miki T, Yoshida LS, Kakinuma K** (1995b) Electron spin resonance studies on neutrophil cytochrome b558: evidence that low-spin heme iron is essential for O₂⁻ generating activity. *J. Biol. Chem.* **270**: 12685-12689.
71. **Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Ukness S, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*. **261**: 754-756.
72. **Gelderblom WC, Kriek NP, Marasas WF, Thiel PG** (1991) Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. *Carcinogenesis*. **12**: 1247-1251.
73. **Gelderblom WC, Marasas WF, Vleggaar R, Thiel PG, Cawood ME** (1992) Fumonisins: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia*. **117**: 11-16.
74. **Gómez-Muñoz A** (1998) Modulation of cell signalling by ceramides. *Biochim. Biophys. Acta*. **1391**: 92-109.
75. **Green MJ, Hill HAO** (1984) Chemistry of dioxygen. *Methods in Enzymology*. **105**: 3-22.
76. **Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K** (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*. **113**: 343-355.
77. **Groom QJ**, (1996) *rbohA*, a rice homologue of the mammalian gp91^{phox} respiratory burst oxidase gene. *Plant. J.* **10**: 515-522.
78. **Groves FD, Zhang L, Chang YS, Ross PF, Casper H, Norred WP et al.** (1999) *Fusarium* mycotoxins in corns and corn products in a high risk area for gastric cancer in Shandong Province, China. *J. AOAC Int.* **82**: 657-662.
79. **Gutiérrez NN, Plascencia J y Gavilanes RM.** (1999) Effects of fumonisin B₁ on the plasma membrane from germinating maize embryos. VI International Workshop of Seed Biology. Mérida, Yucatán. México. Enero 24-28, 1999a.
80. **Gutiérrez-Nájera Nora, Enríquez-Arredondo Consuelo, Garibay Francisco Javier, Palacios-Bahena Silvia, Gavilanes-Ruíz Marina** (2001) La membrana plasmática y su importancia durante la patogénesis en plantas. *Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas* (I. Bernal-Lugo y H. Loza-Tavera, eds).
81. **Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramírez J, Sánchez-Nieto S, Plascencia J, Gavilanes-Ruíz M** (2005) Fumonisin B₁, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta*. **221**: 589-596.
82. **Guyton AC, Hall JE** (1997) *Tratado de Fisiología Médica*. 9ª Edición. Interamericana McGraw-Hill. México. Caps. 33 y 34.
83. **Hakomori SI** (1990) Bifunctional role of glycosphingolipids. *J. Biol. Chem.* **265**: 18713-18716.

84. **Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*. **8**: 1773-1791.
85. **Han CH, Freeman JLR, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD** (1998) Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: identification of an activation domain in p67phox. *J. Biol.Chem.* **273**: 16663-16668.
86. **Hannun YA, Obeid LM** (2002) The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: Stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* **277**: 25847-25850.
87. **Harper AM, Chaplin MF, Segal AW** (1985) Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *Biochem J.* **227**: 783-788.
88. **Harrison LR, Colvin BM, Green JT, Newman LE, Cole JR Jr** (1990) Pulmonary edema and hyfrotorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagnostic Investigation.* **2**: 217-221.
89. **Hartfield PJ, Mayne GC, Murray AW** (1997) Ceramide induces apoptosis in PC12 cells. *FEBS Lett.* **401**: 148-152.
90. **Haschek WM, Motelin G, Ness DK, Harlin KS, Hall WF, Vesonder RF, Peterson RE, Beasley VR** (1992) Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathology.* **117**: 83-96.
91. **Haschek WM, Gumprecht LA, Smith G, Tumbleson ME, Constable PD** (2001) Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine puylmonary edema and current perspectives. *Environ. Health Perspect.* **109**: 251-257.
92. **Hausladen A, Fridocich I** (1994) Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J. Biol.Chem.* **269**: 29405-29408.
93. **Henderson LM, Thomas S, Banting G, Chapell JB** (1997) The arachidonate-activatable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel is contained within the multi-membrane-spanning N-terminal region of the gp91-phox. *Biochem J.* **325**: 701-705.
94. **Humpf HU, Schmelz EM, Meredith FI, Vesper H, Vales TR, Wang E, Menaldino DS, Liotta DC, Merrill AH Jr** (1998) Acylation of naturally occurring and synthetic 1-deoxysphinganine by ceramide synthase. *J. Biol. Chem.* **273**: 19060-19064.
95. **Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL** (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science.* **273**: 1953-1856.
96. **Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Halhbrock K, Scheel D** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and ·O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**: 4800-4805.

97. **JonaK c, Lingerink W, Hirt H** (1999) MAP kinases in plant signal transduction. *Cell and molecular life sciences*. **55**: 204-213.
98. **Kanofsky JR** (1989) Singlet oxygen production by biological systems. *Chem. Biol. Interact.* **70**: 1-28.
99. **Kellerman TS, Marasas WF, Thiel PG, Gelderblom WC, Cawood M, Coetzer JA** (1990) Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of Fumonisin B1. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **57**: 269-275.
100. **Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C** (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell*. **10**: 255-266.
101. **Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J** (2000) Funtional análisis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **97**: 2940-2945.
102. **Lam E, Kato N, Lawton M** (2001) Programed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*. **411**: 848-853.
103. **Lamb C y Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251-275.
104. **Lambeth JD** (2004) Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews immunology*. **4**: 181-189.
105. **Larsson C, Sommarin M, Widell S** (1994) Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out right-side-out vesicles. *Methods Enzymol.* **228**: 451-469.
106. **Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG** (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **273**: 15366-15372.
107. **Lerner RA, Eschenmoser A** (2003) Ozone in biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**: 3013-3015.
108. **Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb CJ** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. *Cell*. **79**. 583-593.
109. **Levine A, Pennell R, Palmer R, Lamb CJ** (1996) Calcium-mediated apoptaosis in a plant hypersensitive response. *Curr. Biol.* **6**: 427-437.
110. **Li YC, Ledoux DR, Bermudez AJ, Fritsche KL, Rottinghaus GE** (1999) Effects of fumonisin B1 on selected immune responses in broiler chickens. *Poultry Sci.* **78**: 1275-1282.

111. **Li FQ, Yoshizawa T, Kawamura O, Luo XY, Li YW** (2001) Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *J. Agriculture and Food Chemistry*. **49**: 4122-4126.
112. **Low PS, Merida JR** (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol. Plant*. **96**: 533-542.
113. **Lynch DV, Dunn TM** (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist*. **161**: 677-702.
114. **Mach JM, Greenberg JT** (2004) In: Free radicals and oxidative stress. Plant Cell Death Processes. Edited by Larry D. Nooden. Elsevier Academic Press. USA. pp 203-214.
115. **Marasas WF, Kellerman TS, Gelderblom WC, Coetzer JA, Thiel PG, van der Lugt JJ** (1988) Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **55**: 197-203.
116. **Matsudaira P** (1987) Sequence from picomole of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**: 10035-10038.
117. **McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.
118. **Melov S** (2001) Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxidodismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J. Neurosci.* **21**, 8348-8353.
119. **Merrill AH Jr, Sullards MC, Wang E, Voss KA, Riley RT** (2001) Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* **109**:283-289.
120. **Merrill AH Jr, van Echten G, Wang E, Sandhoff K** (1993) Fumonisin B₁ inhibits sphingosine (sphinganine) *N*-acyltransferase and *de novo* sphingolipid biosynthesis in cultured neurons *in situ*. *J. Biol. Chem.* **268**: 27299-27306.
121. **Mithöfer A, Daxberger A, Fromhold-Treu D, Ebel J** (1997) Involvement of a NADPH oxidase in the elicitor-inducible oxidative burst of soybean. *Phytochemistry*. **45**: 1101-1107.
122. **Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen network of plants. *Trends. Plant Sci.* **9**: 490-498.
123. **Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ** (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of TX100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **279**: 36277-36286.
124. **Morel JB y Dangl J** (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation*. **4**: 671-683.

125. **Morel J, Fromentin J, Blein JP, Simon-Plas F, Elmayan T** (2004) Rac regulation of NtrbohD, the oxidase responsible for the oxidative burst in elicited tobacco cell. *Plant J.* **37**: 282-293.
126. **Mühling KH, Plieth C, Hansen UP, Sattelmacher B** (1995) Apoplastic pH of intact leaves of *Vinca faba* as influenced by light. *J. Exp. Bot.* **46**: 377-382.
127. **Munkvold GP, Desjardins AE** (1997) Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Disease* **81**: 556-565.
128. **Murphy TM, Auh CK** (1996) The superoxide synthases of plasma membrane preparations from cultured rose cells. *Plant Physiol.* **110**: 621-629.
129. **Nathan C** (2002) Catalytic antibody bridges innate and adaptive immunity. *Science.* **298**: 2143-2144.
130. **Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD** (1999) The p67phox activation domain regulates electron transfer flow from NADPH to flavin in cytochrome *b₅₅₈*. *J. Biol.Chem.* **274**: 22999-23005.
131. **Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann. Rev. Plant Physiol and Plant Mol Biol.* **49**: 249-279.
132. **O'Donnell B, Tew DG, Jons OTG, England PJ** (1993). Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. J.* **290**: 41-49.
133. **Olson PD, Varner JE** (1993) Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J.* **13**: 887-892.
134. **Ono E, Wong HL, Kawasaki T, Hasegawa M, Kodama O, Shimamoto K** (2001) Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 759-764.
135. **Ouchane S, Picaud M, Vernotte C, Astier C** (1997) Photooxidative stress stimulates illegitimate recombination and mutability in carotenoid-less mutants of *Rubrivivax gelatinosus*. *The EMBO J.* **16**: 4777-4787.
136. **Paclet MH, Coleman AW, Vergnaud S, Morel F** (2000) P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome *b₅₅₈* liposomes by atomic force microscopy. *Biochemistry.* **39**: 9302-9310.
137. **Paclet MH, Coleman AW, Burritt J, Morel F** (2001) NADPH oxidase of Epstein-Barr-virus immortalized B lymphocytes. Effect of cytochrome *b₅₅₈* glycosylation. *Eur. J. Biochem.* **268**: 5197-5208.
138. **Paclet MH, Henderson LM, Campion Y, Morel F, Dagher MC** (2004) Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *Biochem. J.* **382**: 981-986.

139. **Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*. **406**: 731-734.
140. **Perry DK, Hannun YA** (1998) The role of ceramida in cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta*. **1436**: 233-243.
141. **Peterson GL** (1977) A Simplification of the protein assay method of Lowry et al., wich is more generally applicable. *Anal. Biochem*. **83**: 346-356.
142. **Pinelli E, Poux N, Garren L, Pipy B, Castegnaro M, Miller DJ, Pfohl-Leszkowicz** (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase by fumonisin B₁ stimulates cPLA₂ phosphorylation, the arachidonic acid cascade and cAMP production. *Carcinogenesis*. **20**: 1683-1688.
143. **Reinbothe S, Reinbothe C, Apel K, Lebedev N** (1996) Evolution of chlorophyll biosynthesis- the challenge to survive photooxidation. *Cell*. **86**: 703-705.
144. **Rentel MC, Lecourieux D, Ouaked F, Usher SL, Petersen L, Okamoto H, Knight H, Peck SC, Grierson SC, Hirt H** (2004) OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature*. **427**: 858-861.
145. **Rheeder JP, Marasas WF, Thiel PG, Sydenham EW, Shephard GS, Van Schalkwyk DJ** (1992) *Fusarium mioniliforme* and fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*. **82**: 353-357.
146. **Rivas SM, Gavilanes-Ruíz M, Placencia J** (2003) Role of the sphingolipids in the accumulation of salicilic acid in germinating maize. XI Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. 5º Simposio México-Estados Unidos. Acapulco, Guerrero. México. Noviembre 3-7, 2003.
147. **Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH** (1992) Cytochrome b₅₅₈: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*. **256**: 1459-1462.
148. **Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH** (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease- on the basis of its chromosomal location. *Nature*. **322**: 32-38.
149. **Sagi M y Fluhr R** (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp 91^{phox} NADPH oxidases. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol*. **126**: 1281-1290.
150. **Sánchez-Nieto S, García-Rubio O, Pacheco-Moises F, Carballo A, Rodríguez-Sotres R, Gavilanes-Ruíz M** (1997) Purification of plasma membrane from dry maize embryos. *Physiologia Plantarum*. **101**: 157-164.

151. **SanJuan BA** (2001) Efecto de la micotoxina fumonisina B₁ sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta de hipersensibilidad en ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
152. **Saucedo M** (2004) Efectos de la fumonisina B₁ y compuestos esfingoideos en la actividad de MAP cinasas en embriones de maíz. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
153. **Sbarra AJ, Karnovsky MJ** (1959) The biochemical basis of phagocytosis: I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **234**: 1355-1362.
154. **Schägger H y von Jagow G** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
155. **Segal AW, Garcia R, Goldstone AH, Cross AR, Jones OTG** (1981) Cytochrome b-245 of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils. *Biochem J.* **196**: 363-367.
156. **Segal AW, West I, Wientjes F, Nugent JH, Chavan AJ, Haley B, Garcia RC, Rosen H, Scrace G** (1992) Cytochrome b₂₄₅ is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J.* **284**: 781-788.
157. **Shao D, Segal AW, Dekker LV** (2003) Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett.* **550**: 101-106.
158. **Shalk I, Zeng K, Wu S-K, Stura EA, Matteson J, Huang M, Tandon A, Wilson IA, Balch WE** (1996) Structure and mutational analysis of Rab GDP-dissociation inhibitor. *Nature.* **381**: 42-48.
159. **Shephard GS, Marasas WF, Leggott NL, Yazdanpanah H, Rahimian H, Safavi N** (2000) Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *J. Agriculture Food Chem.* **48**: 1860-1864.
160. **Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar VK, Dixon RA, Lamb C** (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *The Plant Cell.* **9**: 261-270.
161. **Schmelz EM, Dombrink-Kurtzman MA, Roberts PC, Kozutsumi Y, Kawasaki T, Merrill AH Jr** (1998) Induction of apoptosis by fumonisin B₁ in HT29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **148**: 252-260.
162. **Schoroeder JJ, Crane HM, Xia J, Liotta DC, Merrill AH Jr.** (1994) Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis of fumonisin B₁. *J. Biol. Chem.* **269**: 3475-3481.

163. **Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP** (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* **31**: 137-157.
164. **Smith ER, Jones PL, Boss JM, Merrill AH Jr.** (1997) Changing J774A.1 cells to new medium perturbs multiple signaling pathways, including the modulation of protein kinase C by endogenous sphingoid bases. *J. Biol.Chem.* **272**: 5640-5646.
165. **Soriano JM, Dragacci S** (2004) Occurrence of fumonisins in foods. *Food Res. Int.* **37**: 985-1000.
166. **Soriano JM, González L, Catalá AI** (2005) Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B₁. *Progress in Lipid Research.* **44**: 345-356.
167. **Sperling P, Heinz E** (2003) Plant sphingolipids: Structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1632**: 1-15.
168. **Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ** (1992) Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.* **267**: 13425-13433.
169. **Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ** (1993) Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J. Biol. Chem.* **268**: 15649-15654.
170. **Stockmann-Juvala H, Mikkola J, Nárrala J,Loikkanen J, Elovaara E y Savolainen K** (2004) Oxidative stress induced by fumonisin B₁ in continuous human and rodent neural cell cultures. *Free Radical Res.* **38**: 933-942.
171. **Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzales JA, Levi R, Nathan C** (1991) Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenylene iodonium analogs. *FASEB J.* **5**: 98-103.
172. **Sutherland MW y Learmonth** (1997) The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free Rad. Res.* **27(3)**: 283-289.
173. **Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WF, Shephard GS, Van Schalkwyk DJ, Koch KR** (1990) Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of Transkei, Southern Africa. *J. Agriculture Food Chem.* **38**: 1900-1903.
174. **Tenhaken R, Rübél C** (1999) Cloning of putative subunits of the soybean plasma membrane NADPH oxidase involved in the oxidative burst by antibody expression screening. *Protoplasma.* **205**: 21-28.

175. **Thiel PG, Marasas WF, Sydenham EW, Shephard GS, Gelderblom WC** (1992) The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia*. **117**: 3-9.
176. **Thordal-Christensen H** (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Op. Plant Biol.* **6**: 351-357.
177. **Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp 91^{phox}). *Plant J* **14**: 365-370.
178. **Torres MA, Dangl JL, Jones JDG** (2002) *Arabidopsis* gp91(phox) homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**: 517-522.
179. **Van Asch MAJ, Rijkenberg FHJ, Coutinho TA** (1992) Phytotoxicity of FB₁, moniliform, and T-2 corn callus cultures. *Phytopathology*. **82**: 1330-1332.
180. **Van Regenmortel MHV, Briand JP, Muller S, Plaue S** (1988) Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (19). Synthetic polypeptides as antigens. Elsevier. Netherlands.
181. **Vignais PV** (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 1428-1459.
182. **Vilhardt F, van Deurs B** (2004) The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *The EMBO J.* **23**: 739-748.
183. **Von Goenner M, Schlosser E, Neubacher H** (1993) Evidence from electron-spin resonance for the formation of free radicals during infection of *Avena sativa* by *Drechslera* spp. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **42**: 405-412.
184. **Voss KA, Riley RT, Norred WP, Bacon CW, Meredith FI, Howard PC, Plattner RD, Collins TFX, Hansen DK, Porter JK** (2001) An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. *Environ. Health Perspect.* **109**: 259-266.
185. **Wallach TM, Segal AW** (1997) Analysis of glycosylation sites on gp91^{phox}, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation *in vitro*. *Biochem. J.* **321**: 583-585.
186. **Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH Jr** (1990) Inhibition of sphingolipid metabolism biosynthesis by fumonisins. *J. Biol. Chem.* **22**: 14486-14490.
187. **Wattenberg EV, Badria FA, Shier WT** (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by the carcinogenic micotoxin fumonisin B₁. *Biochem. Biophys. Res. Communi.* **227**: 622-627.

188. **Wentworth P, McDunn JE, Wentworth AD, Takeuchi C, Nieva J, Jones T, Bautista C, Ruedi JM, Gutierrez A, Janda KD, Babior BM, Eschenmoser A, Lerner RA** (2002). Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*. **298**: 2195-2199.
189. **Wilson TM, Ross PF, Rice LG, Osweiler GD, Nelson HA** (1990) Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J. Veterinary Diagnostic Investigation*. **2**: 213-216.
190. **Wilson TM, Ross PF, Owens DL, Rice LG, Green SA, Jenkins SJ Nelson HA** (1992) Experimental reproduction of ELEM. *Mycopathology*. **117**: 115-120.
191. **Wojtaszek P** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322**: 681-692.
192. **Xing T, Higgins VJ, Blumwald E** (1997) Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell*. **9**: 249-259.
193. **Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Page SW, Sphon JA** (1996a) Effects of fumonisin B₁ on oxygen transport in membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**: 250-255.
194. **Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Troy AL, Page SW, Sphon JA** (1996b) Effects of FB₁ and (hydrolyzed) fumonisin backbone AP1 on membranes: A spin-label study. *Arch. Biochem. Biophys.* **335**: 13-22.
195. **Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Page SW, Sphon JA** (1998) Effects of FB₁ on lipid peroxidation in membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* **1371**: 134-142.
196. **Yoshioka H, Sugie K, Park HJ, Maeda T, Tsuda N, Kawakita K, Doke N** (2001) Inductions of plant gp91 *phox* homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol Plant-Microbe Interact.* **14**: 725-736.
197. **Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones DG, Doke N** (2003) *Nicotiana Benthamiana* gp91^{phox} Homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* Participate in H₂O₂ Accumulation and Resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*. **15**: 706-718.
198. **Zhang Y, Dickman MB, Jones C** (1999) The mycotoxin fumonisin B₁ transcriptionally activates the *p21* promoter through a *cis*-acting element containing two Sp1 binding sites. *J. Biol. Chem.* **274**: 12367-12371.
199. **Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW, Song CP** (2001) Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol.* **126**: 1438-1448.
200. **Zeng J, Fenna RE** (1992) X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3Å resolution. *J. Mol. Biol.* **226**: 185-207.