

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Eurípedes de Almeida Ribeiro Júnior



IDENTIFICAÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE EM VEGETAIS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Eurípedes de Almeida Ribeiro Júnior</i>
aprovada pela Comissão Julgadora.
<i>30/05/99 Ione Salgado Martins</i>

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

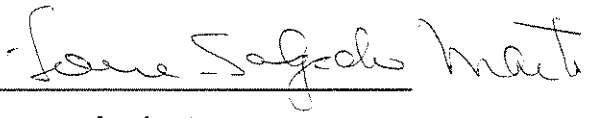
Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado Martins

Data da Defesa: 30/08/1999

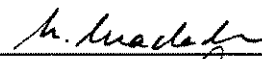
Banca Examinadora

Titulares:

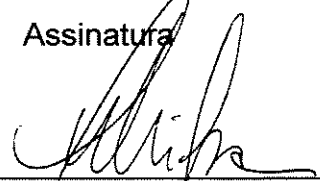
Profa. Dra. Ione Salgado Martins (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Marcos Antônio Machado


Assinatura

Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva


Assinatura

Suplente

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof.^a. Dra. Ione Salgado Martins pela dedicação e empenho na orientação deste trabalho e por viabilizá-lo, além do excelente treinamento em ciência.

Prof.^a. Wirla M. S. C. Tamashiro do Departamento de Microbiologia (UNICAMP) pela colaboração e orientação, fatores que foram importantes para a conclusão deste trabalho.

Prof. Dr. Fernando Q. Cunha do Departamento de Farmacologia (FMRP-USP) pela colaboração e orientação na etapa de determinação da atividade enzimática da NOS.

Aos Professores Drs. Marcos Antônio Machado e Lúcia Pereira da Silva pelas contribuições e participações no exame de qualificação.

Dra. Cecília A. F. Pinto-Maglio do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) pela orientação no processo de coleta dos botões florais de café e fornecimento deste material.

Dra. Maria Elisa A. G. Z. Paterniani do Centro de Plantas Graníferas (IAC) e à Dra. Beatriz M. J. Mendes do CENA-USP pelo fornecimento das sementes de milho e culturas de células de laranja, respectivamente.

A Fabiola L. A. C. Mestriner (FMRP-USP) pela excelente assistência técnica na determinação da atividade enzimática da NOS.

Aos amigos do laboratório da FMRP-USP pelos ensinamentos, momentos sociais e hospedagem.

Aos amigos do laboratório da UNICAMP pelas discussões, auxílios experimentais e momentos agradáveis.

Aos Professores e colegas do curso pelas discussões e sugestões.

Às secretárias, Marina e Andreia, pelo auxílio nos processos burocráticos e a todos os demais funcionários do Departamento de Bioquímica que direta e indiretamente viabilizaram este trabalho.

À FAPESP, CAPES e FAEP pelo suporte financeiro.

A todos meus amigos que contribuíram no processo de adaptação em Campinas e pelos momentos sociais, em especial ao Marcelo Fonseca e Rodrigo Fonseca pela infra-estrutura.

Aos meus pais que me deram educação, carinho, atenção e me apoiaram em todos os momentos. Agradeço também a todos meus familiares.

Ao meu filho, Guilherme M. Ribeiro, que me deu energia e perseverança para a condução deste trabalho.

A Fagoni F. Calegario pelo carinho, companheirismo, sugestões e atenção.

À Divina Trindade que colocou estas pessoas em meu caminho e todas as oportunidades. Agradeço neste oportunidade pela minha saúde e sabedoria.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMO	5
ABSTRACT	7
1.INTRODUÇÃO	9
1.1. O óxido nítrico e seus alvos biológicos	9
1.2. As isoformas da óxido nítrico sintase e suas funções.....	11
1.3. Estrutura da NOS.....	13
1.4. A biossíntese de NO	14
1.5. NOS em organismos inferiores	16
1.6. NO e NOS em vegetais.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Material vegetal.....	22
3.2. Animais	24
3.3. Extração de proteínas.....	24
3.3.1. Extratos vegetais	24

3.3.2. Lisado de macrófagos.....	25
3.3.3. Lisado de cérebro	27
3.4. Dosagem de proteína	27
3.5. <i>Western blot</i>	27
3.6. Preparo de material para imunofluorescência.....	29
3.7. Atividade da NOS	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Imunoreatividade de tecidos vegetais com anti-NOS de mamíferos.....	33
4.2. Imunolocalização da NOS de milho	39
4.3. Atividade NOS em tecidos vegetais	43
5. CONCLUSÕES.....	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7. TRABALHOS PUBLICADOS.....	68
7.1. Comunicações em congressos.....	68
7.2. Publicação em periódico especializado	68

ABREVIATURAS

AMG	Aminoguanidina
BH ₄	(6R)-5,6,7,8-Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina de soro bovino
CaM	Calmodulina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol-bis(β-amino éter)-N,N,N,N-tetracético
FAD	Flavina-adenina-dinucleotídeo
FITC	Isoticianato de fluoresceína
FMN	Flavina-mononucleotídeo
IFN-γ	Inteferon-gama
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
β-NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil ester
L-NMMA	N- monometil- L-arginina
L-NNA	N-nitro-L-arginina
NO	Óxido nítrico
NOH-Arg	N-hidroxi- L-arginina
NOS	Óxido nítrico sintase
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PMSF	Fenil-metilfluoridosulfóxido

RPMI	Meio de cultura celular
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TBS	Tampão tris salino
TMK	Tampão-tris-manitol-cloreto de potássio
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

RESUMO

A enzima óxido nítrico sintase (NOS) é responsável pela síntese de óxido nítrico (NO) através da oxidação da L-arginina a L-citrulina. Esta enzima é encontrada amplamente distribuída na natureza. No reino animal, as isoformas de NOS constitutivamente expressas são frequentemente Ca^{2+} -dependentes e envolvidas em processos fisiológicos enquanto que isoformas de NOS Ca^{2+} -independentes são normalmente induzidas a produzir grandes quantidades de NO em situações patológicas. Evidências da existência de uma via endógena para a síntese de NO no reino vegetal tem surgido nos anos recentes. No presente trabalho investigou-se a presença da NOS em algumas espécies vegetais, avaliando-se a reação cruzada de anticorpos produzidos contra NOS de macrófagos de camundongos e de cérebro de rato com extratos de diferentes tecidos vegetais, e também medindo-se a atividade NOS pela produção de L-[U- ^{14}C]-citrulina a partir de L-[U- ^{14}C]-arginina. Anticorpos contra NOS de macrófagos e NOS de cérebro detectaram uma proteína de aproximadamente 166 kDa em ensaios de *Western blot* com extratos citossólicos de ápices radiculares e folhas jovens de plântulas de milho. A imunolocalização, usando anticorpos contra NOS de macrófagos conjugados com isotiocianato de fluoresceína, revelou esta proteína no citosol das células na zona de divisão bem como no núcleo das células da zona de alongação de ápices radiculares de milho. Os extratos citossólicos de ápices radiculares e folhas jovens de milho apresentaram atividade NOS Ca^{2+} -dependente, medida pela sensibilidade aos inibidores da NOS, como L-NAME, L-NMMA, L-NNA e aminoguanidina. Estes resultados sugerem a existência de uma enzima NOS constitutiva nestes tecidos de milho e que a localização subcelular desta proteína depende da fase de crescimento celular. Extratos citossólicos

derivados de cultura de células de laranja também apresentaram reação cruzada com anticorpos produzidos contra NOS de macrófagos e cérebro. Os extratos citossólicos derivados da região dos pêlos absorventes de raízes de milho apresentaram atividade NOS muito maior, comparada com os ápices radiculares e as folhas jovens. Esta atividade se mostrou Ca^{2+} -independente, sugerindo a existência de uma isoforma induzida nesta zona da raiz. Uma atividade NOS Ca^{2+} -independente também foi detectada em células mãe de grãos-de-pólen de café em diferentes estágios de divisão meiótica sugerindo um papel para esta enzima no processo de microsporogênese de café. O conjunto de resultados indica a existência, em vegetais, de diferentes isoformas de uma enzima do tipo NOS que pode ter um importante papel no controle do crescimento e na diferenciação celular.

ABSTRACT

The enzyme nitric oxide synthase (NOS) is responsible for the synthesis of nitric oxide (NO), from the oxidation of L-arginine to L-citrulline. This enzyme has been found largely distributed in nature. In the animal kingdom, the NOS isoforms constitutively expressed are frequently Ca^{2+} -dependent and involved in physiological processes while Ca^{2+} -independent NOS isoforms are normally induced to produce large amounts of NO under pathological situations. Evidences for the existence of an endogenous pathway for NO synthesis in the plant kingdom has emerged in recent years. In the present work we investigate the presence of NOS in some plant species, by checking the ability of antibodies raised against mouse macrophage NOS and rabbit brain NOS cross-react with lysates prepared from different plant tissues and also measured NOS activity, by L-[U- ^{14}C]-citrulline production from L-[U- ^{14}C]-arginine. Antibodies against macrophage NOS and brain NOS detected a protein of about 166 kDa in Western blot assays of cytosolic fractions of root tips and young leaves of maize seedlings. Immunochemical localization, using antibodies against macrophage NOS, conjugated with fluorescein isothiocyanate, revealed this protein in the cytosol of the cells at division zone as well as in the nucleus of the cells at the elongation zone of maize root tips. Cytosolic fractions of maize root tips and young leaves presented Ca^{2+} -dependent NOS activity, as measured by the sensitivity to NOS inhibitors, such as, L-NAME, L-NMMA, L-NNA and aminoguanidine. These results suggest the existence of a constitutive NOS enzyme in these maize tissues with the subcellular localization of this protein depending on the phase of cell growth. Cytosolic fraction derived from orange cells in culture also presented cross-immunoreactivity with antibodies raised against

macrophage and brain NOS. Cytosolic fraction derived from the maize root hair zone presented a much higher NOS activity compared to root tips and young leaves and this activity was shown to be Ca^{2+} -independent, suggesting the existence of an inducible isoform in this root zone. A Ca^{2+} -independent NOS activity was also detected in coffee pollen mother cells in different stages of meiotic division suggesting a role for this enzyme in the process of microsporogenesis of coffee. The overall results indicate the existence, in plants, of different NOS-like enzyme isoforms, that may have important role in the control of cell growth and differentiation.

1.INTRODUÇÃO

1.1. O óxido nítrico e seus alvos biológicos

Nos meados da década de 80, o óxido nítrico (NO) era apenas mais uma molécula dentre uma longa lista de poluentes ambientais que estava relacionado à chuva ácida e a processos de destruição da camada de ozônio e carcinogênese. No entanto, cinco anos se passaram e diversas evidências mostraram que esta molécula tem um papel importante no funcionamento do corpo humano. Em 1992, vários pesquisadores provaram a síntese de NO no cérebro, artérias, sistema imune, fígado, pâncreas, útero, nervos periféricos e pulmões (Culotta and Koshland Jr, 1992). Ainda nesse ano, devido às inúmeras publicações relevantes nesta área, a revista *Science* elegeu o NO como “a molécula do ano”. Desde então, uma enorme variedade de ações fisiológicas e patofisiológicas em células animais tem sido atribuídas ao NO. A importância destas descobertas levou Louis J. Ignarro, Robert F. Furchgott e Ferid Murad, a receberem o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina em 1998, pelas suas descobertas a respeito do “óxido nítrico como uma molécula sinalizadora no sistema cardiovascular”.

O NO é uma espécie reativa de nitrogênio, relativamente instável e, por apresentar propriedades lipofílicas, pode se difundir com facilidade através das membranas celulares sem o auxílio de transportadores específicos (Mayer and Hemmens, 1997). Estas características tornam o NO uma molécula potencialmente tóxica.

O NO é capaz de formar complexos com proteínas que contêm grupamentos heme, como hemoglobina, mioglobina, citocromo C e guanilato ciclase (Christopherson and Bredt, 1997). Muitas das ações fisiológicas do NO (vasodilatação, inibição da agregação

plaquetária, neurotransmissão) são mediadas por alterações nos níveis de cGMP, devido à ativação da guanilato ciclase, provocada pela ligação do NO ao grupo heme desta enzima (Moncada *et al.*, 1991; Griffith and Stuehr, 1995). Em altas concentrações o NO é também capaz de estimular as ciclooxigenases (ligando-se ao grupo heme destas enzimas) com subsequente aumento na síntese de prostaglandinas (Stadler *et al.*, 1993, Salvemini *et al.*, 1993). Por outro lado, o NO é capaz de inibir o crescimento de células tumorais inibindo a atividade da NADH:ubiquinona oxidoreductase, da NADH:succinato oxidoreductase e da cis-aconitase ao interagir com estas enzimas (Christopherson and Bredt, 1997).

O NO pode também reagir com o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) formando o peroxinitrito ($ONOO^-$) que é altamente tóxico (Beckman *et al.*, 1990), sendo produzido em várias condições patológicas como inflamação crônica e aguda, reperfusão de órgãos isquêmicos, entre outras (Moro *et al.*, 1994). O $ONOO^-$ é uma espécie altamente reativa que causa rápida oxidação de grupos sulfidrilas e tioésteres e também nitração e hidroxilação de compostos aromáticos como tirosina e triptofano (Beckman and Koppenol, 1996). Também causa injúrias ao DNA provocando a quebra de fitas únicas com subsequente ativação da enzima de reparo do DNA, a poli-ADP ribosil transferase (Szabó and Oshima, 1997). A ativação desta enzima rapidamente reduz a concentração celular de seu substrato, o NAD^+ , diminuindo a velocidade da glicólise, o transporte de elétrons pela cadeia respiratória e, como consequência, a formação de ATP, resultando na disfunção e morte celular. Além disto, o dano persistente ao DNA (que ocorre por exemplo na inflamação crônica) pode aumentar a taxa de mutagênese e o risco de câncer (Kröncke *et al.*, 1997). Assim, o mecanismo chave que regula a múltipla atividade do NO é o controle

de sua síntese.

1.2. As isoformas da óxido nítrico sintase e suas funções

O NO é sintetizado em tecidos animais por uma família de enzimas denominada óxido nítrico sintase (NOS), composta de pelo menos três isoformas geneticamente distintas (Förstermann *et al.*, 1995). Estas, foram identificadas inicialmente como bNOS, macNOS e ecNOS por terem sido isoladas originalmente de cérebro, macrófagos e endotélio, respectivamente. Entretanto, verificou-se posteriormente que estas isoformas são expressas em muitos outros tipos de tecidos e que, um determinado tecido pode expressar mais de uma isoforma de NOS. Com o objetivo de evitar confusão na nomenclatura, Förstermann *et al.* (1991) propuseram uma classificação numérica para as diferentes isoformas de NOS, baseada na ordem histórica de purificação e isolamento dos cDNAs das diferentes isoformas.

A isoforma I (NOS I) é Ca^{2+} -dependente, constitutivamente expressa no sistema nervoso central e periférico, tendo sido inicialmente purificada de cerebelo de rato e porco (Bredt and Snyder, 1990; Mayer *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1991). A NOS I cerebral é normalmente solúvel e sua migração corresponde a uma massa molecular de 150-160 kDa em SDS-PAGE - eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (Bredt and Snyder, 1990; Schmidt *et al.*, 1991). O NO produzido por esta isoforma tem um importante papel fisiológico como neurotransmissor, participando na gênese da memória e na regulação do fluxo sanguíneo no cérebro (Moncada *et al.*, 1991; Christopherson and Bredt, 1997). Por outro lado, a excessiva produção de NO pela NOS I pode provocar injúria neuronal durante o derrame, a neurodegeneração aguda e crônica e o ataque epiléptico (Bredt and

Snyder, 1994, Garthwaite and Boulton, 1995).

A NOS II (originalmente descoberta em macrófagos) é encontrada normalmente em condições patológicas, produzindo altas concentrações de NO, representando um componente importante na atividade antimicrobial e antineoplásica. Dependendo da espécie, a atividade da NOS II é grandemente ou completamente independente de Ca^{2+} . Sua expressão é induzida por agentes como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e citocinas (IFN- γ , entre outras), em quase qualquer tipo de célula (Lowenstein *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1993). Não se sabe ainda se algumas células podem expressar a NOS II constitutivamente. Assim como a isoforma I, a NOS-II é predominantemente uma enzima solúvel (Stuehr *et al.*, 1991; Hevel *et al.*, 1991). Em SDS-PAGE, a enzima purificada, a partir de macrófagos de camundongos induzidos, apresenta uma massa molecular de 125-135 kDa (Stuehr *et al.*, 1991; Hevel *et al.*, 1991).

A terceira isoforma, NOS III, é Ca^{2+} -dependente e constitutivamente expressa em células endoteliais. Esta isoforma purificada a partir de células endoteliais de aorta de boi, nativas ou mantidas em cultura, apresenta uma massa molecular de 135 kDa em SDS-PAGE (Pollock *et al.*, 1991). Diferentemente das outras isoformas, a NOS-III é mais do que 90% particulada (Försterman *et al.*, 1991) sendo que a miristoilação da glicina N-terminal é responsável pela associação desta isoforma à membrana (Pollock *et al.*, 1992). O NO produzido pela NOS endotelial está envolvido na regulação da pressão sangüínea, na distribuição do fluxo sangüíneo para os órgãos e na inibição da agregação e adesão plaquetária (Moncada *et al.*, 1997). A produção diminuída de NO pelo endotélio vascular está relacionada com a patofisiologia da diabete, a hemorragia subaracnóide, a injúria que ocorre na reperfusão de órgãos isquêmicos e também com o derrame (Vane, 1994;

Harrison, 1997).

1.3. Estrutura da NOS

Apesar das diferenças quanto ao mecanismo de regulação, peso molecular, sequência de aminoácidos, distribuição tecidual e ativação por cálcio intracelular, as três isoformas de NOS já caracterizadas apresentam uma estrutura comum composta por dois domínios. O domínio redutase que aparece na extremidade C-terminal e contém os sítios de ligação para NADPH, FAD, FMN e CaM, enquanto que, o domínio oxigenase N-terminal apresenta sítios de ligação para L-arginina, BH₄ e o heme. A NOS ativa apresenta uma estrutura **dimérica** formada pelo alinhamento dos domínios oxigenase, com os domínios redutase ligados como extensões independentes (Stuehr, 1997). A ligação de BH₄ e L-arginina estabilizam de maneira sinérgica a forma dimérica da NOS tornando-a resistente à dissociação na presença de SDS (Klatt *et al.*, 1995). Todas as isoformas de NOS são estritamente dependentes de CaM, que parece facilitar a transferência de elétrons dentro do domínio redutase. Uma diferença importante entre as isoenzimas entretanto é que nas NOS tipo I e III, a ligação de CaM e a ativação da enzima responde às concentrações fisiológicas de Ca²⁺, enquanto que, a NOS II apresenta CaM firmemente ligada, sendo por isto totalmente ativa nas mais baixas concentrações de Ca²⁺ encontradas em condições fisiológicas. Por isto a NOS II é sempre referida como Ca²⁺-independente em contraposição às outras duas isoformas Ca²⁺-dependentes (Mayer and Hemmes, 1997).

1.4. A biossíntese de NO

A síntese de NO ocorre através de uma reação em dois passos onde a L-arginina é primeiramente oxidada ao intermediário N-hidroxi-L-arginina (NOH-Arg) e, posteriormente, através da oxidação deste, são produzidos NO e L-citrulina (Figura 1). Esta reação ocorre com a participação de cofatores redox (Leone *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1991; Marletta, 1993; Stuehr, 1997) que são necessários para a atividade da NOS, tais como: (1) NADPH, que é o verdadeiro doador de elétrons nas duas etapas da reação; (2) FAD e FMN, cofatores que canalizam os elétrons do NADPH para o heme; (3) Heme, onde o ferro reduzido pela transferência de um elétron vindo do NADPH se liga ao oxigênio molecular, que é então clivado, liberando um átomo de oxigênio como água, sendo o outro incorporado em um dos nitrogênios guanidinos terminais da arginina para produzir o intermediário NOH-Arg; em seguida, a ativação de outra molécula de oxigênio facilita a oxidação do NOH-Arg, produzindo água, NO e L-citrulina; (4) Calmodulina (CaM), que tem o papel de desencadear a transferência de elétrons das flavinas para o grupo heme e finalmente (5) Tetrahydrobiopterina (BH₄), com função ainda pouco esclarecida, mas de grande importância para a catálise da reação de síntese de NO a partir da L-arginina. Na ausência desse cofator, alguns produtos tais como ânion nitroxila (NO⁻) e L-citrulina podem ser formados pela NOS, mas somente com a adição de substratos como NOH-Arg e NADPH (Rusche *et al.*, 1998).

Análogos da L-arginina (Figura 2), com substituições no nitrogênio guanidino terminal, têm-se mostrado altamente seletivos na inibição de várias isoformas da NOS, dando suporte para o estudo e classificação das isoformas (Whittle, 1995). Neste contexto, vários análogos da L-arginina tais como N-monometil- L-arginina (L-NMMA), N-nitro-L-

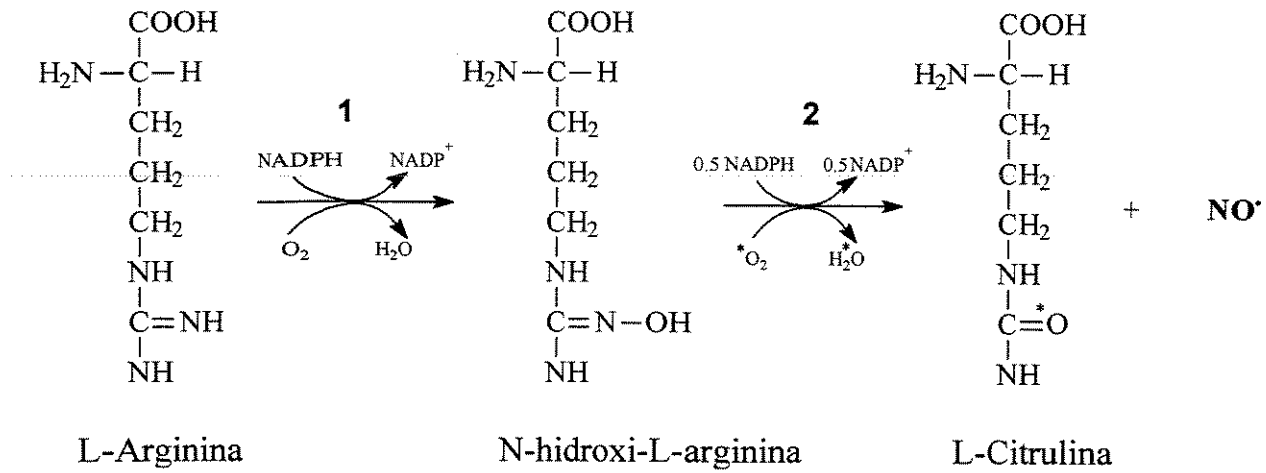


Figura 1- Participação da NOS nas reações 1 e 2 que levam à conversão da L-arginina em L-citrulina e NO (Griffith and Stuehr, 1995).

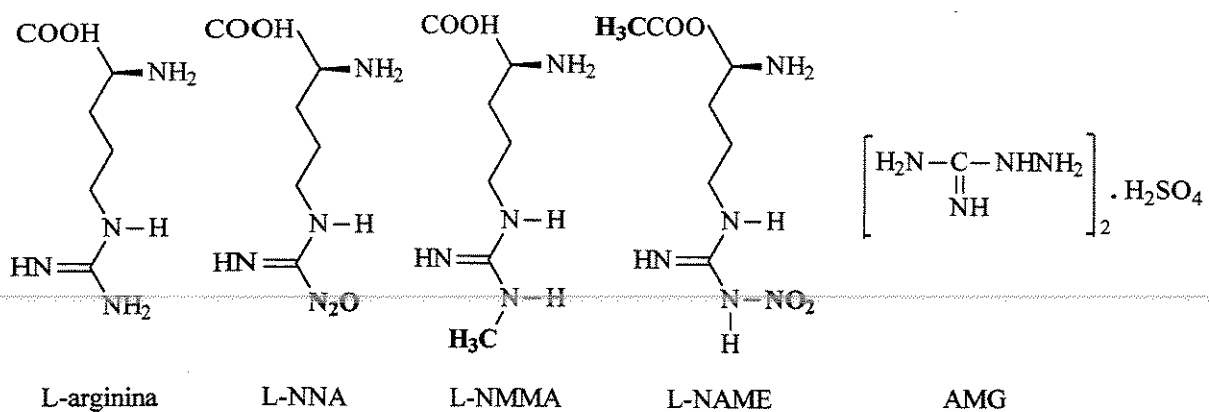


Figura 2 – Estrutura da L-arginina e dos inibidores da NOS.

arginina (L-NNA) e N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) são descritos como potentes inibidores das isoformas constitutivas e Ca^{2+} -dependentes (Whittle, 1995). Em contrapartida, a aminoguanidina (AMG) que não é simplesmente um análogo da L-arginina, foi relatado como um importante inibidor da isoforma induzida e Ca^{2+} -independente (Misko *et al.*, 1993). No entanto, todos estes compostos podem prontamente causar inibição das diferentes isoformas da NOS, mas em diferentes níveis (Whittle, 1995).

1.5. NOS em organismos inferiores

A expressão da NOS não está restrita a mamíferos, uma vez que já foi detectada em praticamente todas as classes de animais inferiores, sugerindo assim que seu aparecimento ocorreu no início do processo evolutivo. Esta enzima já foi detectada em todos os grupos de vertebrados (Schober *et al.*, 1994; Zielinski *et al.*, 1996). Em invertebrados a NOS foi encontrada inicialmente na Classe Crustácea (Radomski and Martin, 1991). Posteriormente, foi observado que esta enzima parece estar presente em praticamente todo o Filo Invertebrado (Martínez, 1995), inclusive no celenterado *Hydra vulgaris*, o mais primitivo invertebrado com sistema nervoso, onde a NOS participaria do mecanismo de alimentação, por provocar a movimentação dos tentáculos (Colasanti *et al.*, 1995).

A NOS de *Drosophila* já foi sequenciada e mostrou possuir 43% de identidade total com a NOS de rato (Regulski and Tully, 1995). Em um tipo de percevejo hematófago, foi demonstrado que o NO produzido nitrosila uma hemeproteína (nitrosilhemeproteína) da glândula salivar deste inseto, que age como um vasodilatador e anti-agregante plaquetário no momento da sucção do sangue, um efeito comparável ao da NOS-III de mamíferos

(Ribeiro and Nussenzveig, 1993). No bicho da seda, a NOS do tecido lipídico é induzida por lipopolissacarídeos bacterianos, enquanto que, nos túbulos de Malpighi, duas isoformas constitutivas já foram descritas (Choi *et al.*, 1995).

Em *Trypano soma cruzi*, a NOS apresenta-se com atividades similares às descritas em tecidos endoteliais e nervoso de mamíferos (Paveto *et al.*, 1995). No reino Fungi, em *Physarum polycephalum*, também foi relatada a ocorrência de uma enzima com massa molecular em torno de 130 kDa com atividade semelhante à da NOS induzida de macrófago. Esta tem sua atividade aumentada durante a mitose, principalmente na fase "S" do ciclo celular (Werner-Felmayer *et al.*, 1994). A atividade da NOS em *Neurospora crassa* foi também relatada e a produção de NO relacionada ao processo de fotoconidiação deste fungo (Ninnemann and Maier, 1996). Chen e Rosazza (1995) purificaram e caracterizaram uma enzima de bactéria (*Nocardia Species*) com atividade semelhante à da NOS, a qual estaria envolvida no mecanismo de infecção e virulência deste microorganismo.

1.6. NO e NOS em vegetais

Evidências recentes suportam a existência de um sistema enzimático para a síntese de NO no reino vegetal, à semelhança do encontrado em animais. Atividade óxido nítrico sintase em células vegetais, determinada pela formação de L-citrulina a partir de L-arginina foi primeiramente observada em raízes de mucuna (*Mucuna hassjoo*) (Ninnemann and Maier, 1996) bem como em raízes e nódulos de tremoço branco (*Lupinus albus*) onde atividade NADPH-diaforase foi também localizada (Cueto *et al.*, 1996). Caro e Puntarulo (1998) demonstraram a produção de NO através da técnica de ressonância eletrônica

paramagnética (EPR) em extratos de fração citossólica de eixo embrionário de soja. Foi sugerido que uma fração deste NO produzido, poderia ter sido gerada pela nitrato redutase, a qual converte nitrato a nitrito e esse a NO, em condições ácidas, e a outra fração, provavelmente, via uma enzima do tipo NOS. Essa produção poderia atuar como um sistema antioxidante reduzindo a produção de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pelos microsomos.

A participação de uma enzima do tipo-NOS no mecanismo de defesa de plantas ao ataque de patógenos foi recentemente demonstrada (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998). Quando plantas são atacadas por determinado patógeno, para o qual apresentam resistência, estas podem desenvolver uma reação de hipersensibilidade, que é caracterizada por uma necrose local do tecido. Esta reação impede o estabelecimento do patógeno na planta e pode também ser induzida por aplicação de eliciadores, que são compostos sintéticos ou isolados a partir do patógeno, capazes de induzir a produção de fitoalexinas, substâncias produzidas pela planta, consideradas como protetoras ao ataque de patógenos (Hammond-Kosack and Jones, 1997; Lamb and Dixon, 1997).

Já está bem estabelecido que a reação de hipersensibilidade em plantas resistentes é desencadeada por uma rápida produção de espécies reativas de oxigênio, como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como resultado da ativação de uma NADPH oxidase de membrana plasmática (Lamb and Dixon, 1997). Este disparo oxidativo afeta a estrutura da parede celular (Bradley *et al.*, 1992) e induz a expressão de vários genes da planta envolvidos na proteção e defesa celular (Levine *et al.*, 1994; Jabs *et al.*, 1997), bem como é necessário para iniciar o processo de morte celular do hospedeiro (Lamb and Dixon, 1997; Levine *et al.*, 1994). Entretanto, este disparo oxidativo

não é suficiente para explicar a reação de hipersensibilidade que confere forte resistência da planta ao patógeno (Jabs *et al.*, 1997; Glazener *et al.*, 1996). Recentemente, foi demonstrado que o NO, aplicado ou produzido endogenamente por uma enzima do tipo NOS, é capaz de potencializar a ação de intermediários reativos de oxigênio, na indução de morte celular por hipersensibilidade, em células de soja em cultura (Delledonne *et al.*, 1998). O NO foi também capaz de induzir, independentemente das espécies reativas de oxigênio, a expressão de genes envolvidos na síntese de fitoalexinas. Inibidores da síntese de NO comprometeram a resposta de folhas de *Arabidopsis* ao ataque de *Pseudomonas syringae*, permitindo o crescimento da bactéria e o desenvolvimento da doença. A inoculação de folhas de fumo com o vírus do mosaico do fumo, induziu uma atividade NOS no material resistente, mas não no suscetível. Ainda, a administração de substâncias doadoras de NO ou a introdução de NOS de mamíferos em folhas ou células em suspensão de fumo induziram a síntese de proteínas relacionadas com mecanismos de defesa da planta (Durner *et al.*, 1998). Estes resultados demonstraram que uma enzima do tipo NOS constitui um componente importante para a reação de hipersensibilidade das plantas resistentes.

Embora existam poucos registros sobre a função do NO em vegetais, alguns trabalhos tem mostrado que o metabolismo vegetal pode ser influenciado por este radical. A exposição de *Picea abies* ao NO foi capaz de provocar um rápido e alto incremento na concentração de cGMP (Pfeiffer *et al.*, 1994), provavelmente através da ativação da guanilato ciclase, um conhecido alvo do NO em células animais (Schmidt and Walter, 1994). A ativação da guanilato ciclase poderia, também, explicar a observação de que substâncias liberadoras de NO são capazes de estimular a germinação e as alterações no requerimento de luz para a quebra de dormência, mediada por fitocromos, em sementes

de *Paulownia tomentosa* (Giba *et al.*, 1994). Isto porque, é conhecido que o cGMP, produto da guanilato ciclase, participa do mecanismo de fototransdução mediado por fitocromos (Bowler *et al.*, 1994). Substâncias doadoras de NO, quando aplicadas em baixas concentrações provocaram a expansão em folhas de ervilha (Leshem and Hamaraty, 1996) enquanto que, em altas concentrações, estes compostos foram capazes de induzir a produção de fitoalexinas em tubérculos de batata (Noritake *et al.*, 1996) e de reduzir a velocidade de amadurecimento ou senescência de frutos e flores de diversas espécies de plantas, provavelmente devido à inibição da síntese ou ação do etileno (Leshem *et al.*, 1998).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Gouvêa *et al.*, 1997) mostraram que a aplicação exógena de NO é capaz de induzir o crescimento de raízes de milho (*Zea mays* L.). A elongação de pontas de raízes de milho foi estimulada quando estas foram expostas a concentrações nanomolares de substâncias capazes de liberar NO, tais como, nitrosoglutationa, nitrosocisteína e nitroprussiato de sódio. Esta indução de crescimento foi prevenida por azul de metileno, conhecido antagonista da ação do NO. Esses resultados sugeriram a possibilidade desse radical participar da via de sinalização envolvida com o crescimento e a diferenciação de células vegetais (Gouvêa *et al.*, 1997).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Os materiais vegetais, citados abaixo, foram selecionados para a realização dos ensaios experimentais por representarem diferentes modelos de crescimento e diferenciação celular, pela facilidade de obtenção de material e/ou pela vantagem de existirem estudos anteriores mostrando respostas de crescimento destes tecidos ao NO.

Sementes de milho (*Zea mays* L., cv. Maia Normal) foram esterilizadas e colocadas para germinar em condições assépticas, no escuro, em câmara incubadora B. O. D. (mod. 347 CD, FANEM, Brasil), a 30 °C. Como suporte para germinação, foi utilizado papel de filtro embebido em água bidestilada na presença ou ausência de EGTA 1 mM. Depois de 3 dias de germinação, segmentos apicais de raízes primárias (com aproximadamente 5 mm de comprimento), segmentos da região dos pêlos absorventes e das folhas jovens foram utilizados como amostras. As sementes foram cedidas pela Dra. Maria Elisa A. G. Z. Paterniani do Centro de Plantas Graníferas do Instituto Agronômico de Campinas.

Culturas de células de laranja doce (*Citrus sinenses* (L) Osbeck cv. Pera), provenientes de cultura de calos estabelecidas a partir de núcelos, foram aclimatadas e mantidas em meio líquido de Murashige & Skoog (1962) com vitaminas de Murashige & Tucker (1969), acrescido de sacarose 50 g/L, myo-inositol 0,1 g/L, extrato de malte 0,5 g/L, 6-benzil aminopurina (6BA) 10 mg/L, sob agitação constante de 150 rpm em agitador rotatório (série 25, New Brunswick Scientific Co., Inc.) a 26°C, no escuro. Estas células foram peneiradas em peneiras de 45 µm, lavadas em meio contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo EDTA 1 mM, sedimentadas a 1000 x g por 2 min e utilizadas para a

extração de proteínas. Os calos e células de laranja doce em suspensão foram gentilmente cedidos pela Dra. Beatriz M.J. Mendes do CENA-USP.

Botões florais de café (*Coffea arabica* L., c.v. Bourbon amarelo) foram coletados do banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas de acordo com técnicas descritas por Pinto-Maglio (1987).

Os ramos de café foram coletados no mês de setembro, num estágio de desenvolvimento contendo botões florais em fase de dormência. Estes ramos foram colocados em vasos contendo água para a indução da divisão meiótica das células mãe do pólen (microsporogênese). Posteriormente, foram aspergidos abundantemente com água e cobertos com plástico para deixá-los numa temperatura levemente superior à temperatura ambiente. Após 24 horas iniciaram-se exames citológicos periódicos, ao microscópio, para detectar o início da microsporogênese. Logo que se constatou o início da divisão meiótica, prosseguiram-se os exames periódicos, com frequência de duas horas, afim de determinar as diferentes fases da divisão celular.

As células que se encontravam nas fases de paquíteno ou diacinese, metáfase I e tétrade da microsporogênese foram coletadas separadamente e processadas para a determinação da atividade da NOS como descrito adiante.

Para os exames citológicos, os botões florais foram fixados em Carnoy (álcool etílico:ácido acético glacial na proporção 3:1 (v/v)) e corados com carmim acético. As observações e registro das fases da microsporogênese destes botões foram realizadas no Instituto Agronômico de Campinas utilizando-se microscópio de contraste de fase.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos, machos e fêmeas, da linhagem BALB/c com 8 a 9 semanas de idade, para o preparo de lisados de tecido cerebral e de macrófagos peritoniais. Os animais foram obtidos do Centro Multiinstitucional de Bioterismo (CEMIB/UNICAMP) e mantidos em ambiente com temperatura controlada, com água e ração *ad libitum* até a sua utilização nos experimentos.

3.3. Extração de proteínas

3.3.1. Extratos vegetais

As proteínas dos tecidos de milho ou células de laranja (0,5 g/mL) foram extraídas em tampão contendo Tris-HCl 100 mM (pH 7,4); ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM; sacarose 250 mM; KCl 20 mM; ditioneitol (DTT) 10 mM; fenil-metilfluoridosulfóxido (PMSF) 50 µg/mL; benzamidina 100 µM e antipaina 50 µM. As amostras foram maceradas em cadinhos de porcelana, contendo nitrogênio líquido, até a total pulverização dos grânulos. Os macerados, com pH abaixo de 6,5 foram ajustados com NaOH 0,8 M para pH 7,2 e a seguir foram centrifugados em duas etapas (Figura 3), primeiro a 3.000 x g por 20 min (extrato bruto) e finalmente a 12.000 x g por 15 min (extrato citossólico) a 4 °C. Uma parte do sobrenadante resultante foi concentrado (extrato citossólico concentrado) utilizando-se membrana Centricon-10 (Amicon, Beverly, MA, USA). Ao sobrenadante foi adicionado o tampão de amostra para eletroforese (Sigma, 2x concentrado), contendo

SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,004% e Tris-HCl 125 mM pH 6,8, na proporção de 1:1 (v/v). Esta suspensão foi fervida por 5 min e centrifugada por 2 min em microcentrífuga Eppendorf a temperatura ambiente. O sobrenadante resultante foi dividido em alíquotas, que foi armazenado em Biofreezer a -70 °C, para ser utilizado nos ensaios de *Western blot*.

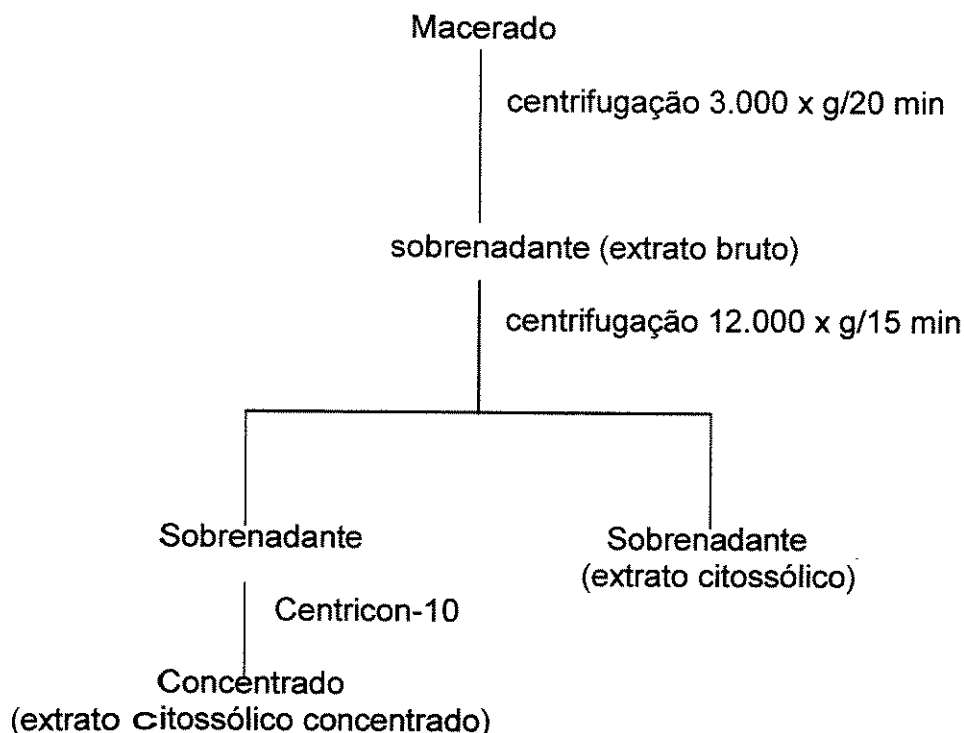


Figura 3 – **Esquema do preparo de extratos vegetais para a utilização em ensaios de *Western blot*.**

3.3.2. Lisado de macrófagos

Os camundongos foram estimulados para o elicitação de macrófagos, com injeção intra peritônio (3 mL) de meio de tioglicolato a 3% (GIBCO). Após 4 dias, as

células foram coletadas da cavidade peritonial com 3,0 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma). Essas foram sedimentadas por centrifugação a 1200 rpm por 10 min em centrífuga (REVAN) refrigerada a 4° C, ressuspensas em meio RPMI e a concentração da suspensão celular ajustada para $2,0 \times 10^6$ células/mL, com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Esta suspensão celular foi empregada para a preparação de monocamadas de células em placas de Petri descartáveis de 100x20 mm (CORNING). Nestas, foram semeadas 1×10^7 células/5,0 mL de meio RPMI com SFB a 10% (Nutricel) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma), que foram incubadas por 2 horas a 37°C, em estufa umidificada com CO₂ a 5%. Após a remoção das células não aderidas (lavagem com PBS pH 7,2), as monocamadas (90% de macrófagos) foram incubadas em meio RPMI com SFB a 10%, lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 20 ng/mL e interferon gama (IFN-γ) 56 UI/mL para a indução da NOS tipo II (Ding *et al.*, 1988). Os procedimentos até esta etapa foram realizados em condições assépticas.

Após 12 horas, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, as células foram lavadas 3 vezes com PBS pH 7,2 para a remoção dos indutores e excesso de proteínas do meio. Posteriormente, 1mL de tampão de amostra para eletroforese foi adicionado a cada placa de Petri e com o auxílio de espátulas, as células lisadas foram coletadas. Os lisados celulares foram fervidos por 5 min, em banho-maria e centrifugados por 5 min a 12.000xg (Centrífuga Eppendorf 5415C) para a remoção dos restos celulares. Os sobrenadantes resultantes foram separados em alíquotas e armazenados em Biofreezer a -70 °C. Estes foram utilizados como controle da NOS tipo II nos ensaios de *Western blot*.

3.3.3. Lisado de cérebro

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical para a retirada do tecido cerebral. Esse foi rapidamente homogeneizado, com auxílio do Potter-Elvehjem, em 5 volumes do tampão de lise (SDS 1%, vanadato de sódio 1,0 mM e Tris-HCl 10 mM pH 7,4) e fervido por 15 segundos em forno microondas. O lisado resultante foi centrifugado por 5 min a 12.000xg (centrífuga Eppendorf 5415 C), a temperatura ambiente, para a remoção do material insolúvel. Ao sobrenadante foi adicionado tampão de amostra para eletroforese (Sigma, 2x concentrado) na proporção de 1:1 (v/v). Esta suspensão foi fervida por 5 min e centrifugada por 2 min em microcentrífuga Eppendorf a temperatura ambiente. O sobrenadante resultante foi dividido em alíquotas e armazenado em Biofreezer a -70 °C para ser utilizado como controle positivo da NOS tipo I nos ensaios de *Western blot*.

3.4. Dosagem de proteína

As concentrações de proteínas das amostras utilizadas para os ensaios de *Western blot* foram determinadas pelo método de Lowry modificado (Peterson, 1977) utilizando BSA 1 mg/mL como padrão.

3.5. *Western blot*

Os extratos de proteínas totais (150 µg para extratos vegetais, 10 µg para lisado de macrófago e 50 µg para lisado de cérebro) preparados como descrito acima, foram

submetidos juntamente com o padrão de massa molecular (LMW eletrophoresis, Pharmacia Biotech), a eletroforese em SDS-PAGE (Laemmli, 1970) utilizando Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), com gel de empilhamento a 3%, gel de separação a 7% e corrente elétrica de 25 mA por gel durante 2 h. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas (Mini Trans Blot Eletrophoresis Transfer Cell, Bio-Rad) eletroforéticamente (Towbin *et al.*, 1979, com modificações) para membrana de nitrocelulose 0,45 μ m (Schleicher & Schüll, Keene, NH, USA) durante 2:00 h a 180 mA em tampão Tris base 25 mM (Sigma), glicina 192 mM, SDS 1% (Sigma) e etanol 18,4% (Merck). Para checar a eficiência de transferência, o gel foi corado por 30 min em metanol:ácido acético:água 5:1:15 (v/v/v) e Comassie Brilliant Blue R (Bio-Rad) 0,25% e descorado em ácido acético:metanol:água 3:2:35 (v/v/v).

As proteínas na membrana de nitrocelulose foram visualizadas por coloração reversível com Ponceau (0,2%), ácido acético (0,1%), ácido tricloacético (3,0%) e ácido sulfosalicílico (3,0%). Posteriormente, a membrana foi lavada com água destilada para retirada do corante e bloqueada por 1 h à temperatura ambiente em tampão Tris salino [TBS - 20 mM Tris (pH 7,6), NaCl 137 mM] contendo 0,05% Tween 20 (TBS-Tween) e 5% de leite em pó desnatado. Após três lavagens em TBS-Tween, a membrana foi incubada overnight a 4 °C com anticorpo IgG_{2a} anti-macNOS de camundongo 0,5 μ g/mL ou com imunoglobulina policlonal de coelho anti-bNOS de pituitária de rato 2 μ g/mL (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA).

Após a incubação, a membrana foi lavada seis vezes durante 1 h com TBS-Tween e tratada com uma solução contendo 2 μ g/mL do anticorpo secundário (IgG de coelho anti-Ig de camundongo para revelar anti-macNOS ou IgG de carneiro anti-Ig de coelho

para revelar o anti-bNOS, ambos conjugados com peroxidase (HRPO), preparados e cedidos gentilmente pela Dra. Wirla M. S. C. Tamashiro, Laboratório de Inflamação do Departamento de Microbiologia e Imunologia-UNICAMP). Para a revelação, a nitrocelulose foi lavada seis vezes, durante uma hora, com TBS-Tween e exposta a uma solução de 3, 3'-diaminobenzidina 0,6 mg/mL, Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e H₂O₂ 0,003%.

O peso molecular médio da proteína de interesse, reconhecida pelos anticorpos anti-NOS, foi calculado com base na curva de migração (R_f vs. log) das proteínas, miosina (212 kDa), α -macroglobulina (170 kDa), β -galactosidase (116 kDa), transferina (76 kDa) e desidrogenase glutâmica (53 kDa), do padrão de massa molecular (LMW electrophoresis, Pharmacia Biotech).

3.6. Preparo de material para imunofluorescência

Ápices radiculares de milho foram segmentados longitudinalmente ou transversalmente, mantendo as regiões da coifa, meristema apical e região mais distal contendo tecidos meristemáticos. Estes foram imersos em solução contendo Tris-HCl 20 mM (pH 7,2), manitol 50 mM, KCl 50 mM (solução TMK) e posteriormente fixados (30 min) em solução contendo formol e TMK na proporção 1:6 (v/v). O material foi lavado em TMK três vezes durante 15 minutos, permeabilizados em TMK contendo TritonX-100 0,2% (30 min) e lavados três vezes durante 15 minutos com TMK.

Para reduzir as ligações inespecíficas, os segmentos foram pré-incubados durante 1 hora em TMK-BSA 3% e posteriormente incubados overnight a 18 °C com IgG_{2a} anti-macNOS conjugado com isoticianato de fluoresceína (FITC) 10 µg/mL (Transduction

Laboratories) ou com uma IgG_{2a} irrelevante (mAb anti-proteínase do Trypanosoma cruzi conjugado com FITC, 250 µg/mL, preparado e cedido gentilmente pela Dra. Wirla M. S. C. Tamashiro), ambos diluídos em TMK-BSA 3%. O excesso do anticorpo foi removido por quatro lavagens com TMK-BSA 3% durante duas horas. Após estes tratamentos, os segmentos foram montados entre lâminas e lamínulas e imersos em solução TMK contendo glicerol 50% e examinados sob o sistema de laser confocal (MRC 1024UV, Bio-Rad), equipado com laser Argônio-Kriptônio (Ar-Kr), laser UV e acoplado ao microscópio invertido Axiovert 100 (Zeiss). O comprimento de onda utilizado para a excitação do FITC foi de 488 nm (laser Ar-Kr) e para aquisição e processamento das imagens foi empregado um microcomputador Pentium 150 MHz (Compaq) equipado com o programa OS/2.

3.7. Atividade da NOS

A atividade total da NOS em tecidos vegetais (milho, café e laranja) foi determinada pelo método da produção de L-[U-¹⁴C] citrulina a partir da L-[U-¹⁴C] arginina (Rees *et al.*, 1995).

O tecido vegetal (500 mg) foi homogeneizado durante 1 min com auxílio de um pistilo (Aggregat PT-DA 3007/2) acoplado a um politron (PT 3100, Kinematica AG Dispersing and Mixing Technology, Switzerland) em 200-300 µL do tampão de homogeneização gelado [Tris-HCl 50 mM pH 7,4; sacarose 320 mM; DTT 5 mM; leupeptina (Sigma) 10 µg/mL; inibidor de tripsina de soja 10 µg/mL (Sigma); aprotinina 2 µg/mL (Sigma) e PMSF 1 mM (Sigma)]. Para os extratos de café, que se oxidam com maior intensidade, utilizou-se 10 mM de DTT no tampão de homogeneização, além de 10

mM de glutathiona reduzida.

O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. Quarenta microlitros do sobrenadante resultante foi misturado em 100 µL do tampão de ensaio para atividade da NOS [KH₂PO₄ 50 mM pH 7,2; MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 0,2 mM; valina 50 mM; L-citrulina 20 µM; L-[U-¹⁴C] arginina 60 µM (0,05 µCi); DTT 1 mM; β-NADPH 100 µM, (6R)-5, 6, 7, 8-tetrahidrobiopterina (H₄B) 50 µM; FAD 3 µM; FMN 4 µM; CaM (CaM) 3,5 µg/mL].

Após a incubação, a reação foi interrompida com a adição de 1mL de uma suspensão de Dowex- Ag 50W (200-400, 8% carregada com Na⁺ em água destilada) pH 5,5 na proporção de 1:1 (v/v). Posteriormente, a resina foi removida por centrifugação a 5.000 x g por 10 min e o sobrenadante coletado. Quatrocentos microlitros deste sobrenadante foi homogeneizado em 3 mL de líquido de cintilação para a determinação da radioatividade em contador de cintilação (Beckman, LS 6000). A eficiência da resina na adsorção da L-[U-¹⁴C] arginina foi conferida em reação conduzida na ausência de amostras e também em reação sem a adição de Dowex.

A atividade da NOS nas amostras foi avaliada pela conversão da L-[U-¹⁴C] arginina a L-[U-¹⁴C] citrulina na ausência (controle) ou na presença de inibidores específicos da NOS, sendo que a atividade da NOS consiste na diferença entre estes tratamentos. Como controles internos foram utilizados lisados cerebrais e de macrófagos de camundongos para verificar a presença de atividade NOS constitutiva/Ca²⁺-dependente e induzida/ Ca²⁺-independente, respectivamente. A possibilidade de conversão não enzimática da L-[U-¹⁴C] arginina foi eliminada uma vez que não se observou formação de L-[U-¹⁴C] citrulina, quando os extratos de proteínas foram fervidos.

Como inibidores, foram usadas soluções de L-NAME, AMG, L-NNA, L-NMMA a 3

mM que foram adicionadas independentemente ou em combinação no tampão de ensaio para NOS. Para a determinação da atividade dependente ou independente de cálcio (Ca^{2+}) as amostras foram também incubadas na presença de EGTA 2 mM.

A concentração de proteína para estes ensaios foi determinada pelo método de ligação com o Coomassie blue, utilizando o reagente de determinação de proteína (Bio-Rad) e BSA como padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Imunoreatividade de tecidos vegetais com anti-NOS de mamíferos

Com o objetivo de detectar a presença de uma enzima tipo NOS em plantas, extratos celulares de alguns vegetais foram testados em ensaios de *Western blot* com anticorpos produzidos contra isoformas de NOS de origem animal. A alta conservação filogenética que tem sido observada entre as diferentes isoformas da NOS (Förstermann *et al.*, 1995) deram suporte à realização deste tipo de investigação. Já foi mostrado que a sequência total de aminoácidos, deduzida a partir do cDNA das três isoenzimas humanas, apresenta cerca de 59% de identidade. Entre as espécies, as seqüências dos aminoácidos são mais que 90% idênticas para as NOSs I e III e maior que 80% para a NOS II (Forstermann *et al.*, 1995).

Como pode ser observado na Figura 4, anticorpos produzidos contra a NOS II, proveniente de macrófagos (anti-macNOS) reconheceram uma proteína de massa molecular de aproximadamente 166 kDa nos extratos citossólicos de ápices radiculares de milho. Como esperado, uma proteína de aproximadamente 130 kDa estava presente no lisado de macrófago de camundongo. A reação imunológica nos tecidos vegetais foi melhor evidenciada nas amostras que foram centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C e concentradas utilizando-se membranas Centricon-10 (extrato citossólico concentrado). Assim, este procedimento foi escolhido para o preparo dos extratos vegetais a serem utilizados nos ensaios subsequentes de *Western blot*.

Além dos ápices radiculares, extratos preparados a partir de folhas jovens de milho

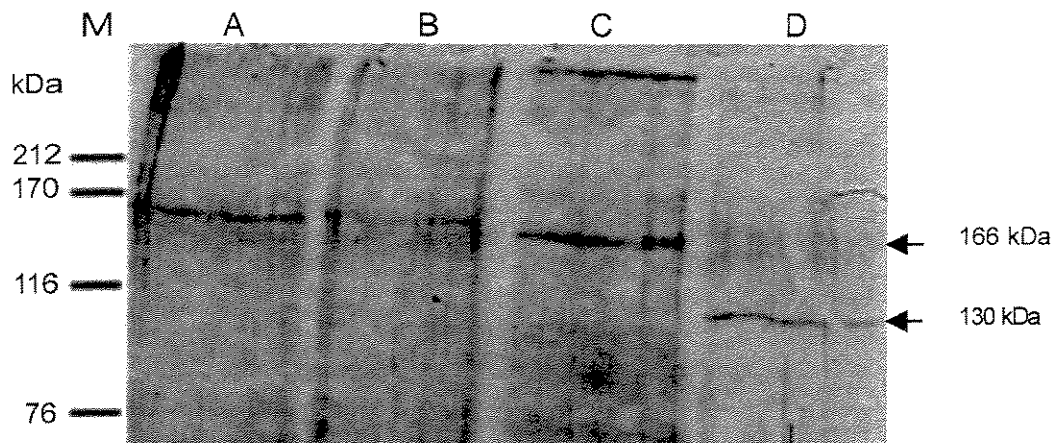


Figura 4- *Western blot* utilizando anticorpo contra a óxido nítrico sintase de macrófago (NOS tipo II). M, padrão de massa molecular; A-C, extratos de ápices radiculares de milho, sendo A, extrato bruto; B, extrato citossólico; C, extrato citossólico concentrado e D, lisado de macrófago de camundongo induzido.

também apresentaram reação positiva para o anticorpo anti-macNOS, enquanto aqueles provenientes da região dos pêlos absorventes da raiz de milho não foram capazes de reagir com este anticorpo (Figura 5). Estes resultados indicaram que a imunoreatividade dos tecidos de milho, para o anticorpo anti-macNOS, está restrita aos tecidos que contêm grande proporção de células meristemáticas ou que, a proteína com imunoreatividade para NOS esteja em concentrações mais baixas em tecidos diferenciados, desta forma não sendo detectada pelo *immunoblotting*. É provável também que as proteínas nesses tecidos possuam um epítipo diferente das demais isoformas da NOS.

O anticorpo anti-macNOS também reconheceu uma proteína de aproximadamente 166 kDa nos extratos citossólicos de laranja indicando que uma proteína com similaridade à NOS de macrófagos também está presente nestas células (Figura 6), sugerindo que esta proteína pode estar presente em diversas espécies vegetais.

Quando se utilizou anticorpos policlonais produzidos contra a NOS I de pituitária rato, (anti-bNOS), os extratos de ápices radiculares ou folhas jovens de milho também apresentaram uma proteína de aproximadamente 166 kDa com reação imunológica positiva (Figura 7), enquanto uma proteína imunoreativa nos extratos de laranja apresentou massa molecular de aproximadamente 155 kDa, o mesmo da NOS de cérebro (Figura 8).

As Figuras 5-8 mostram que extratos vegetais apresentam também proteínas de massas moleculares inferiores a 166 kDa (103-109 kDa, 67 kDa e 54 kDa) com reações cruzadas tanto para os anticorpos contra NOS induzida quanto para NOS constitutiva, indicando uma possível reação inespecífica com outras proteínas que são diferentes da NOS. No entanto, estas bandas podem ser atribuídas ao processo de degradação durante a extração de proteínas, que pode ocorrer caso o tampão de extração não esteja

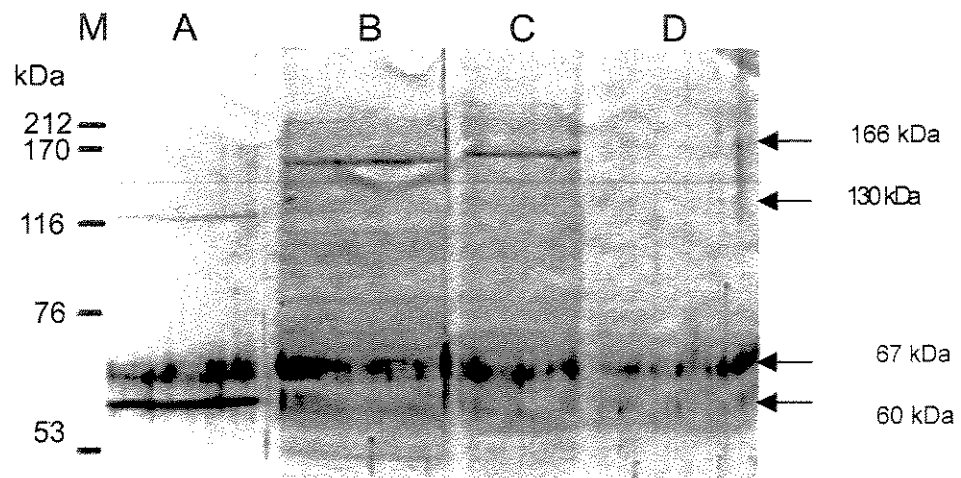


Figura 5- **Imunoreatividade de diferentes tecidos de milho contra NOS do tipo II.** M, padrão de massa molecular; A, lisado de macrófago de camundongo induzido; B-D, extratos citossólicos concentrados de plântulas de milho sendo B, ápice radicular; C, folha jovem; D, região dos pêlos absorventes.

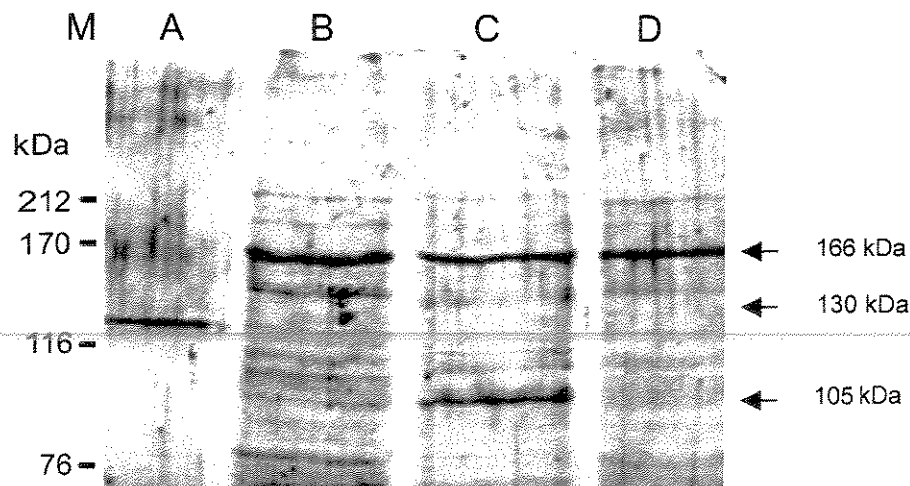


Figura 6- **Immunoblotting da NOS do tipo II com tecidos de milho e laranja.** M, padrão de massa molecular; A, lisado de macrófago de camundongo induzido; B, ápice radicular de milho; C, células de laranja; D, folha jovem de milho.

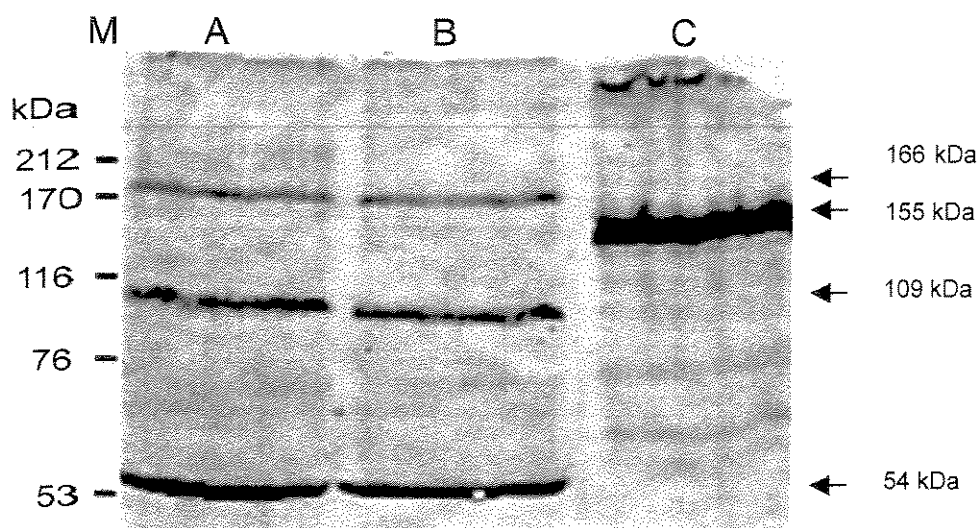


Figura 7- **Western blot** utilizando anticorpo contra a óxido nítrico sintase cerebral (NOS do tipo I). M, padrão de massa molecular; A, ápice radicular de milho; B, folha jovem de milho; C, lisado cerebral de camundongo.

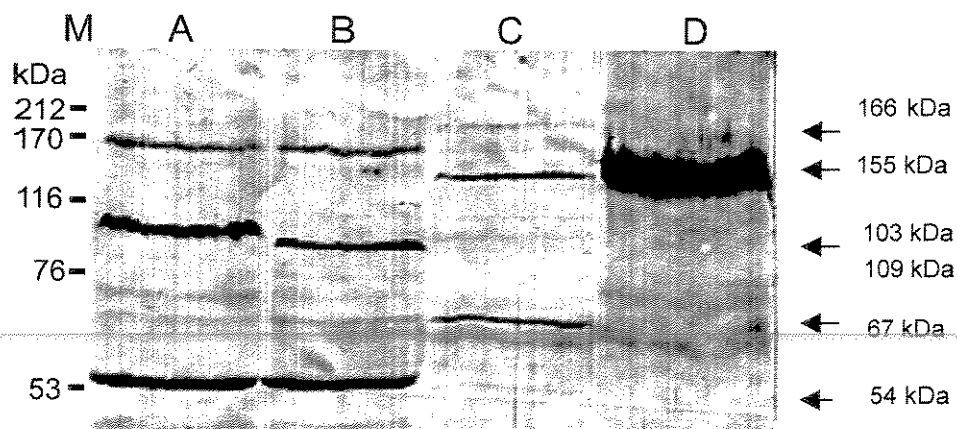


Figura 8- **Immunoblotting** da NOS do tipo I com milho e laranja. M, padrão de massa molecular; A, ápice radicular de milho; B, folha jovem de milho; C, células de laranja e D, lisado cerebral de camundongo.

adequado quanto as concentrações ou a especificidade das anti-proteases adicionadas. As bandas de massas moleculares menores também aparecem em lisados animais, sendo que o aumento dessas é melhor evidenciado com aumento do tempo de preparo e armazenamento da amostra. Nas figuras 7 e 8, observa-se também que a soma das massas moleculares de algumas proteínas imunoreativas em extratos vegetais (109 kDa e 54 kDa) apresenta um valor muito próximo de 166 kDa. Estes fatos sugerem que estas proteínas podem representar produtos de degradação da NOS, visto a baixa estabilidade dessa enzima que perde rapidamente a atividade durante o armazenamento a -80 °C, além de ser facilmente degradada, estruturalmente, durante o manuseio (Springall *et al.*, 1992; Tracey *et al.*, 1994).

A observação de que anticorpos produzidos contra duas isoformas de NOS de mamíferos mostraram reação cruzada com extratos de ápices radiculares, folhas jovens de milho e extratos de cultura de células de laranja, sugere a existência de uma enzima similar à NOS nessas espécies. Essa com epitopo antigênico comum às isoformas do tipo NOS I e II de mamíferos. Neste estudo é importante ressaltar que os anticorpos utilizados foram produzidos a partir de fragmentos da porção C-terminal da proteína recombinantemente expressa (NOS I, resíduo 1095-1289 da proteína de rato; NOS II, resíduo 961-1144 da proteína de camundongo). Esses fragmentos da NOS analisados por alinhamento comparativo com as seqüências de aminoácidos das proteínas disponíveis no *GenBank* possuem 30 % de identidade e 45 % de similaridade com a NADPH-citocromo P450 redutase de plantas que apresenta massa molecular em torno de 79 kDa e localização subcelular na membrana do retículo endoplasmático (Meijer *et al.*, 1993). Ainda, várias isoformas da NADPH-ferridoxina redutase (40 a 42 kDa) que são

encontradas nos cloroplastos de folhas e raízes de diversas espécies de plantas (Newman and Gray, 1988; Aoki *et al.*, 1994) também apresentam identidades de 21 a 29 % e similaridade de 44 a 47 % com estes fragmentos da NOS. Nestes casos, embora exista a possibilidade de ocorrer reação cruzada entre anticorpos da NOS com estas oxidoredutase de plantas, os resultados mostram que as proteínas reconhecidas pelos anticorpos contra NOS têm massas moleculares que se aproximam mais dos produtos de degradação da NOS do que destas oxidoredutases. Ainda, resultados mais recentes de nosso laboratório têm mostrado que um melhor controle na degradação de proteínas durante o preparo do extrato vegetal (como aumento da concentração de anti-proteases) tem eliminado o aparecimento das bandas menores no *Western blot*.

4.2. Imunolocalização da NOS de milho

Os ápices radiculares das plantas apresentam uma zona de divisão celular que contém o meristema apical e o tecido meristemático subjacente, seguida pela zona de alongação celular. Entre estas duas principais zonas existe uma região caracterizada pela presença de uma fase pós-mitótica, onde a taxa de divisão celular é cada vez menor e a alongação celular é ainda lenta (Baluska *et al.*, 1994). Com o objetivo de localizar a imunoreatividade para a enzima similar à óxido nítrico sintase nas diferentes zonas radiculares, raízes de milho foram incubadas com anticorpo anti-macNOS conjugado com o fluoróforo FITC e analisadas sob microscopia confocal de fluorescência. Essa análise demonstrou que as células do ápice radicular contêm considerável imunoreatividade com uma proteína similar à NOS, a qual é diferentemente distribuída nas células contidas em cada zona de crescimento e desenvolvimento da planta. Na região da raiz que contém o

meristema apical e o tecido meristemático subjacente, a imunoreatividade estava, predominantemente, localizada no citoplasma, enquanto nenhuma marcação foi observada no núcleo (Figuras 9A e 9B). As células da coifa, que protegem a região meristemática da raiz, não apresentaram marcação alguma.

A imunomarcação citossólica com o anti-macNOS-FITC apresentava-se cada vez menor à medida que se afastava da zona de divisão celular. As células presentes na transição entre a zona de divisão celular e alongação celular mostraram imunomarcação tanto no citossol quanto em torno do núcleo (Figura 9C). A imunolocalização nas células da zona de alongação foi mais evidente no núcleo sendo que essas células são caracterizadas por um proeminente vacúolo e um tamanho maior que as demais células da extremidade (Figura 9D). Controles realizados com anticorpos fluorescentes irrelevantes, ou apenas com o tampão de incubação, não apresentaram nenhuma fluorescência, mostrando que os resultados obtidos com o anti-macNOS-FITC não eram inespecíficos.

A observação de que a imunolocalização da NOS no citossol das células da zona meristemática (meristema apical e subjacente) migra em direção ao núcleo à medida que se aproxima da zona de alongação, indica que a localização subcelular da proteína imunoreativa com anti-NOS depende da fase de crescimento e desenvolvimento celular.

Em células animais o NO tem sido apontado como um importante mediador da diferenciação induzida por fatores de crescimento. Nesses organismos a expressão da NOS na fase mitótica de crescimento foi descrita como um pré-requisito no processo de paralisação do crescimento, que é necessário para favorecer a diferenciação das células neuronais PC12 induzida pelos fatores de crescimento (Peunova and Enikolopov, 1995). A formação de NO é também requerida no estágio inicial de diferenciação monocítica dos

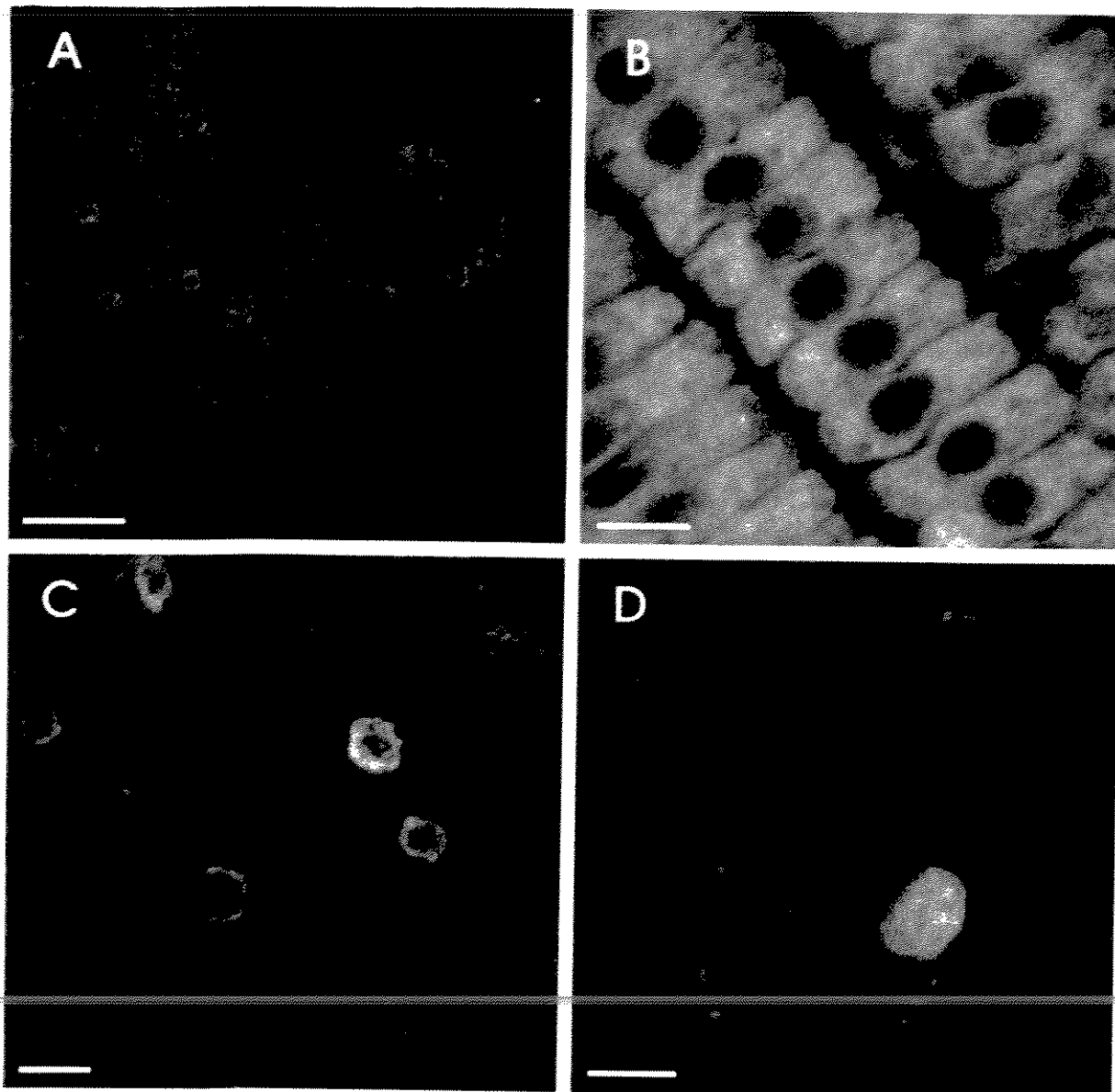


Figura 9 – Imunofluorescência do ápice radicular de milho utilizando anticorpo anti-macNOS conjugado com FITC. A e B: Seção mostrando intensa marcação no citoplasma das células do meristema apical e tecido meristemático subjacente. C: Seção do tecido de transição entre a zona de divisão celular e a zona de alongação, mostrando marcação em torno do núcleo. D: Células da zona de alongação com intensa imunomarcação no núcleo. Barra de escala: A, 50 μm e B-D, 10 μm .

monoblastos humanos U937 induzidos pela vitamina E-succinato (Kim *et al.*, 1997). Uma função semelhante para esta enzima na diferenciação celular de raízes de milho poderia explicar os resultados.

A migração da proteína NOS-imunoreativa citossólica, sintetizada durante a fase mitótica de crescimento, em direção ao núcleo na região de elongação, poderia implicar a participação desta proteína na ativação de fatores de transcrição, necessários para suportar a rápida taxa de crescimento, característica da zona de elongação (Erickson and Sax, 1956). Estes resultados apoiam as observações anteriores, em nosso laboratório, de indução de crescimento de raízes de milho por NO, (Gouvêa *et al.*, 1997).

Embora altas concentrações de NO possam causar danos no DNA e afetar a transcrição celular, o controle da dimerização da NOS, que é necessária para sua atividade (Mayer and Hemmens, 1997), pode prevenir as propriedades citotóxicas do NO (Kronche *et al.*, 1997). Em células neuronais, a atividade NOS é inibida por uma proteína de baixo peso molecular, que previne a dimerização da enzima (Jaffrey and Snyder, 1996). Esta proteína, denominada PIN, parece ser altamente conservada na natureza, tendo sido também encontrada em *Arabidopsis Thaliana* (Jaffrey and Snyder, 1996). A presença de tal proteína nas raízes de milho poderia regular a produção de NO neste tecido. Alternativamente, a expressão controlada de diferentes isoformas de NOS pode diferenciar o papel do NO como molécula mensageira no processo de crescimento vegetal das propriedades citotóxicas deste radical no mecanismo de defesa de plantas ao ataque de patógenos (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998).

4.3. Atividade NOS em tecidos vegetais

A atividade enzimática da NOS nos tecidos vegetais foi determinada pelo método da produção de L-[U-¹⁴C] citrulina a partir da L-[U-¹⁴C] arginina. Como foram utilizados extratos brutos para a realização dos ensaios de atividade, é importante considerar outras vias metabólicas que podem utilizar a L-arginina ou os cofatores do ensaio ou ainda metabolizar a L-citrulina produzida (Wu and Morris, 1998).

Durante o ciclo da uréia, a arginase produz L-ornitina a partir da L-arginina que posteriormente é catabolizada pela ornitina-carbamoil-transferase a L-citrulina. Bactérias, fungos e algas verdes não possuem arginase, no entanto, essa enzima é amplamente distribuída em animais, alguns fungos e plantas (Wu and Morris, 1998; Gruhn and Boyle 1991; Schubert and Boland, 1990). Esta interferência foi prevenida pela adição em excesso de valina (50 mM), um inibidor da arginase. Além disto, caso a arginase ainda produzisse alguma ornitina no ensaio, essa seria removida pela resina Dowex do mesmo modo que a L-arginina, bem como outros produtos que estivessem positivamente carregados a pH 5,5. Outra interferência poderia ser promovida pela via de biossíntese das poliaminas. Esta é iniciada pela ação da arginina ou ornitina descarboxilase que convertem a L-arginina e/ou L-ornitina em L-agmatina ou L-putrescina. Entretanto, estes produtos primários da via das poliaminas, sendo positivamente carregados, são removidos pelo Dowex. A L-citrulina pode ainda ser produzida a partir da L-arginina pela arginina deiminase. Entretanto, esta via até agora só foi encontrada em procariotos (Choi *et al.*, 1998)

A L-citrulina pode ser metabolizada pelas enzimas argininosuccinato sintetase ATP-dependente, ornitina transcarbomoilase fosfato-dependente ou citrulina hidrolase, as quais

produzem ornitina. A possibilidade de ocorrência da primeira via pode ser excluída porque esta necessita de ATP que não foi adicionado no tampão de ensaio, a não ser que a concentração no extrato bruto utilizado seja suficiente para sua atividade. A atividade da citrulina hidrolase, pode ser suprimida pelo excesso de L-citrulina (20 μ M) presente no meio de reação. Ainda, a atividade destas enzimas, principalmente da ornitina transcarbomilase fosfato-dependente que não é bem controlada, poderia produzir a ornitina que também seria adsorvida pelo Dowex, o que subestimaria o valor de L-[U- 14 C] citrulina produzida no ensaio. Assim, a possibilidade de interferência de outras vias metabólicas, na determinação da atividade NOS, foi minimizada. Outro recurso importante utilizado para certificar que a L-[U- 14 C] citrulina produzida seria proveniente da oxidação da L-[U- 14 C] arginina catalizada por uma enzima do tipo NOS, foi a utilização de análogos da L-arginina com substituições no nitrogênio guanidino terminal (Figura 2) que, em mamíferos, têm-se mostrado seletivos na inibição das diferentes isoformas da NOS (Whittle, 1995). Assim, os análogos L-NNA e L-NAME inibem mais eficientemente as NOSs constitutivas enquanto que o L-NMMA não apresenta preferência para uma isoforma específica, inibindo qualquer uma delas com a mesma eficiência. Outro inibidor utilizado foi a AMG que é capaz de inibir com maior eficiência a NOS do tipo induzível (Holstad *et al.*, 1997).

Partindo-se destas considerações, a atividade NOS nos extratos de milho foi avaliada pela produção de L-[U- 14 C] citrulina sensível aos inibidores da NOS. Nestes experimentos, ápices radiculares (Figura 10A) e folhas jovens (Figura 10B) não apresentaram diferenças significativas de sensibilidade aos inibidores utilizados. Estes resultados sugeriram que nos tecidos utilizados possam existir isoformas com afinidade

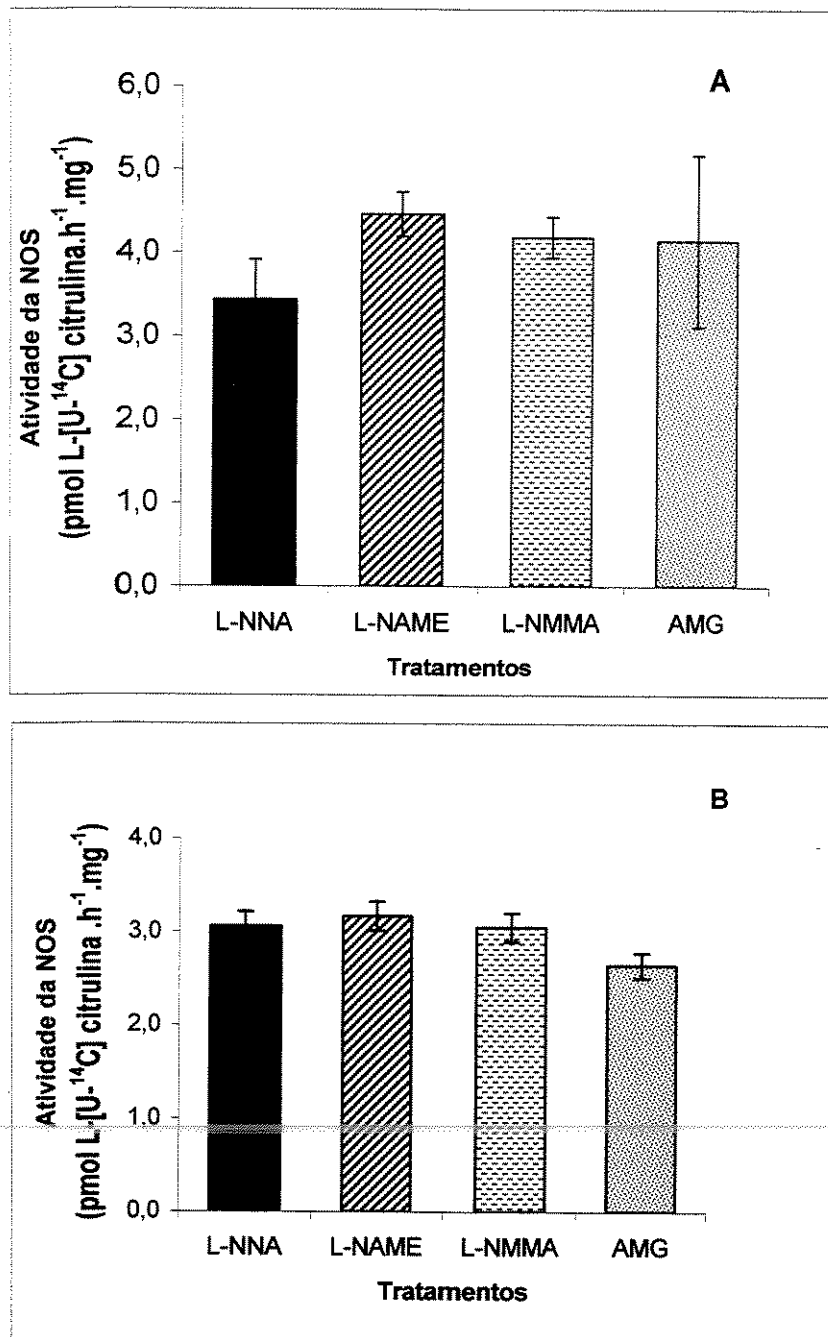


Figura 10 – Produção de L-[U-¹⁴C]citrulina sensível aos inibidores da NOS. Atividade da NOS foi conduzida a 25°C durante 60 min. (A) Ápices radiculares; (B) Folhas jovens. Cada valor representa a diferença entre o total de L-[U-¹⁴C]citrulina produzida na ausência e na presença dos inibidores indicados, na concentração de 3 mM. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de três repetições com duplicata.

diferenciada pelos inibidores ou que a NOS existente seja inibida por todos análogos da L-arginina na mesma proporção. Para verificar esta suposição, os inibidores, L-NAME e AMG (3 mM) foram adicionados independente ou concomitantemente no tampão de ensaio. A produção total de L-[U-¹⁴C] citrulina no controle e na presença dos inibidores foi determinada (Figura 11A) e a partir destes resultados a atividade NOS foi calculada (Figura 11B). Os dois análogos reduziram a produção de L-[U-¹⁴C] citrulina a valores próximos, não sendo observado nenhum efeito aditivo dos inibidores considerados preferencias da NOS constitutiva (L-NAME) e induzida (AMG). Provavelmente esses inibidores possuem especificidade semelhante pela NOS, os quais estariam competindo pelo sítio da enzima quando adicionados ao mesmo tempo. Estes resultados sugeriram que as propriedades e os mecanismos catalíticos da NOS de plantas parecem ser distintos dos observados em NOS de origem animal.

Embora não tenham ocorrido diferenças, a aminoguanidina e o L-NAME foram escolhidos para prosseguir os ensaios, visto serem considerados inibidores preferenciais da NOS induzida/ Ca^{2+} -independente e da constitutiva/ Ca^{2+} -dependente, respectivamente. Os ensaios seguintes foram realizados com o objetivo de se caracterizar a dependência de Ca^{2+} da enzima presente nos tecidos de milho. A Figura 12A apresenta a formação total de L-[U-¹⁴C] citrulina nos extratos de folhas de milho tanto na ausência quanto na presença dos inibidores da NOS (L-NAME e AMG) ou ainda na presença de EGTA que remove o Ca^{2+} do meio. Visto que as propriedades da NOS de planta não são conhecidas, nestes ensaios procurou-se testar também o efeito do tempo de incubação na produção de L-citrulina. A determinação da L-[U-¹⁴C] citrulina só foi possível a partir de 15 minutos de incubação. Na presença de EGTA a formação de L-[U-¹⁴C] citrulina foi reduzida na mesma proporção do observado na presença dos inibidores da NOS. Estes resultados

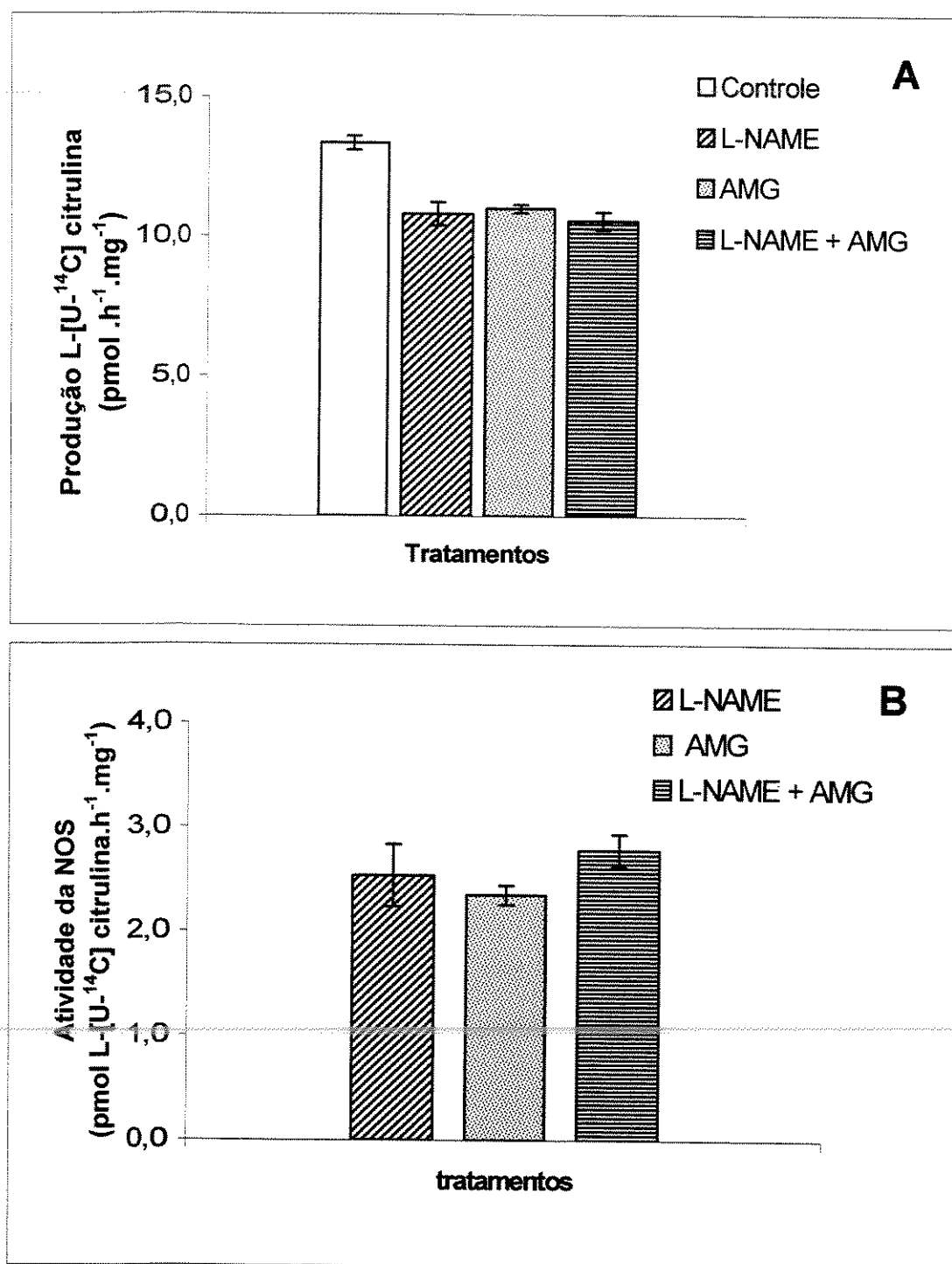


Figura 11 – Efeito dos inibidores da NOS sobre a produção de L-[U-¹⁴C]citrulina em extratos de raiz de milho. A reação foi conduzida a 25°C durante 30 min. (A) Produção total L-[U-¹⁴C]citrulina e (B) Atividade da NOS. Os resultados representam a média ± erro padrão de quatro repetições com duplicata.

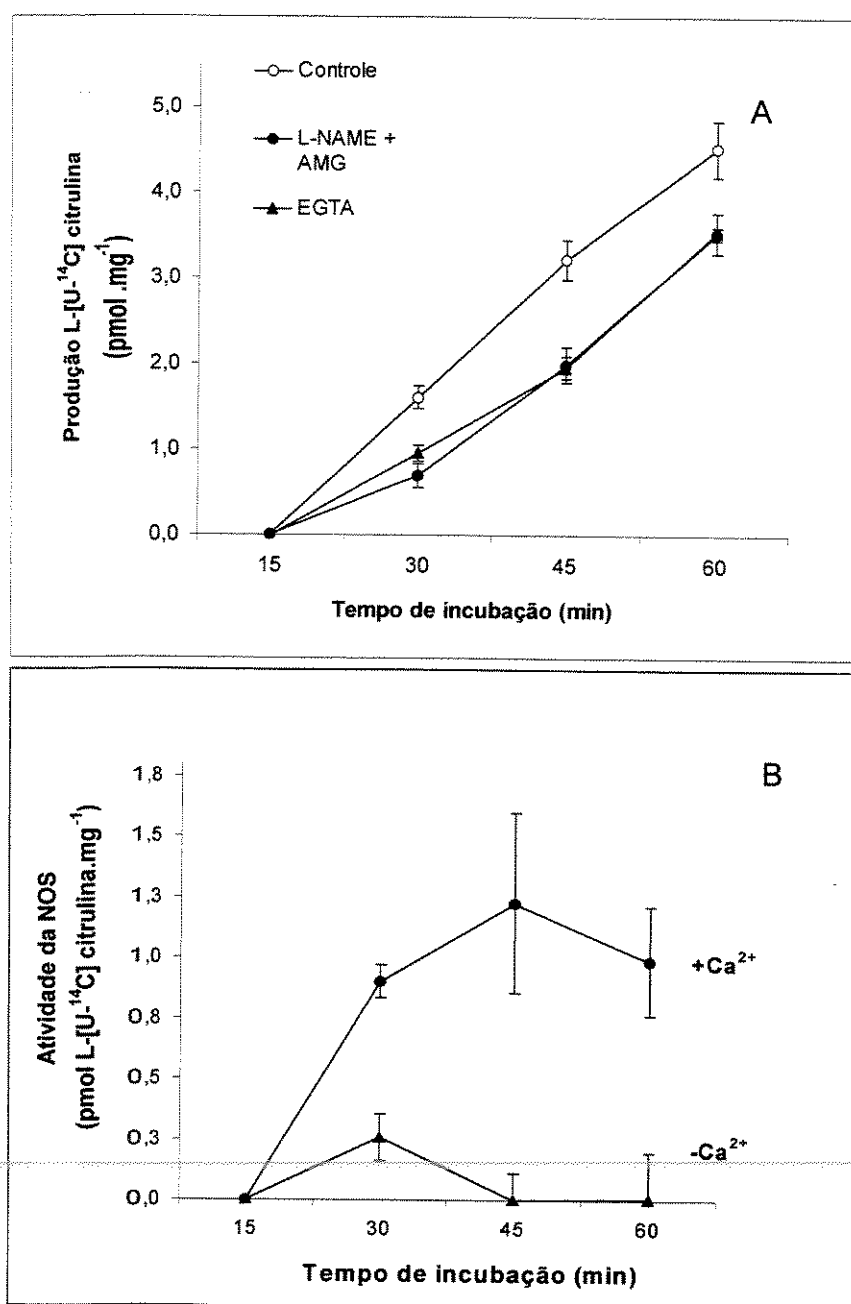


Figura 12 –Atividade da NOS Ca²⁺-dependente em folhas jovens de milho em função do tempo de reação. A reação foi conduzida a 25°C durante os tempos indicados. (A) Produção de L-[U-¹⁴C]citrulina total e (B) Atividade da NOS Ca²⁺-dependente. Os dados representam os valores médios $\pm$ erro padrão de quatro repetições com duplicata.

mostraram que a atividade da NOS nas folhas jovens de milho é Ca^{2+} -dependente. Como mostra a Figura 12B, a adição de EGTA 2 mM, foi responsável pela inibição total da atividade da NOS calculada para extratos de folhas jovens. Comportamento semelhante é observado em extratos de cérebro de camundongos, que possuem em abundância a isoforma da NOS constitutiva dependente de Ca^{2+} (Bredt and Snyder, 1990).

A atividade da NOS nos ápices radiculares e nas folhas jovens de milho foi também comparada com a da região dos pêlos absorventes das raízes de milho, obtendo-se os valores de 4,64; 3,37 e 7,84 pmol L-[U- ^{14}C] citrulina $\cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivamente (Figura 13). Estes resultados mostraram que a região dos pêlos absorventes apresenta uma maior atividade NOS em relação aos outros tecidos analisados. Ainda nesta região, a atividade NOS mostrou ser Ca^{2+} -independente (Figura 13). A partir destes resultados é sugerido que os pêlos absorventes possuem uma isoforma do tipo induzida e Ca^{2+} -independente que é diferente da observada nos outros tecidos de milho. O resultado da Figura 5, onde não se observou reação imunológica dos pêlos absorventes com o anticorpo anti-macNOS, apoia a idéia de que estes tecidos teriam uma isoforma diferente. Entretanto, deve-se considerar o fato de que o preparo de extratos a partir de tecidos da região dos pêlos absorventes é dificultado, uma vez que, esta região é bastante fibrosa. Assim, não se pode também descartar a possibilidade de que o resultado negativo para este tipo de tecido nos ensaios de *Western blot* não seja devido à dificuldade de extração de proteínas.

Nas células animais, as isoformas de NOS Ca^{2+} -dependentes são constitutivas e envolvidas em processos fisiológicos. A dependência de Ca^{2+} e a baixa atividade da enzima presente nos ápices radiculares, quando comparada à atividade encontrada na região dos pêlos absorventes (Figura 13) sugerem que a isoforma presente neste tecido seria do tipo constitutiva. Estes resultados vão de encontro aos obtidos nos ensaios de

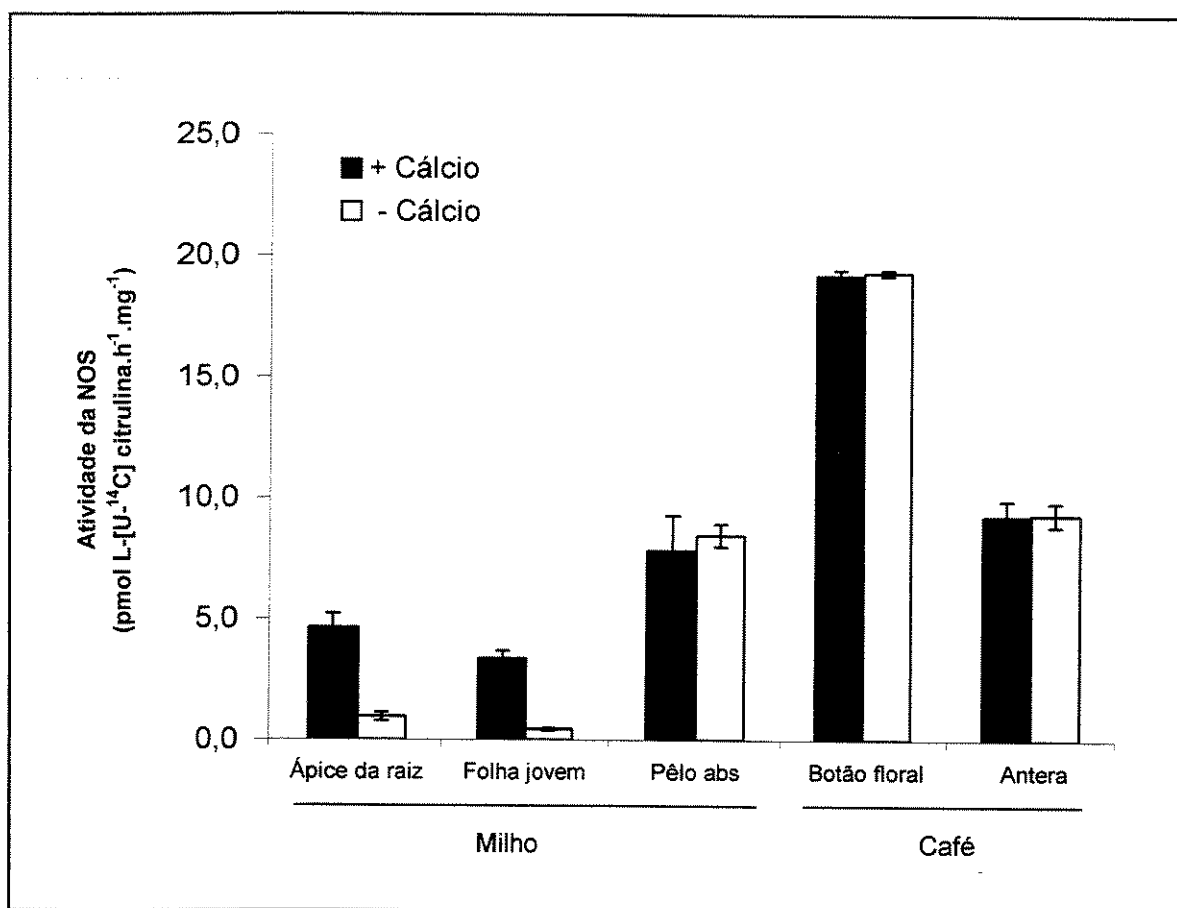


Figura 13 – **Atividade da NOS Ca^{2+} -dependente e Ca^{2+} -independente em milho e café.** A atividade da NOS foi calculada utilizando-se os inibidores L-NAME e AMG (3 mM). A reação foi incubada durante 30 min a 25°C. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de dois experimentos com duas repetições cada e duplicata.

imunolocalização (Figura 9) onde, a distribuição da proteína NOS-imunoreativa sugere a participação desta enzima na diferenciação celular.

As determinações de atividade da NOS dos pêlos absorventes mostraram que esta região apresenta alta atividade, quando comparada a outras regiões da planta, e que esta atividade é do tipo Ca^{2+} -independente. Interessantemente esta região da raiz de milho apresenta alta atividade NAD(P)H oxidase (Valle *et al.*, 1994). Esse sistema redox é também encontrado em neutrófilos (Clark *et al.*, 1987), em células endoteliais e na musculatura lisa vascular (Pagano *et al.*, 1995). Acredita-se que o radical superóxido produzido por estas oxigenases interaja com o NO, contribuindo para a atividade bactericida dos neutrófilos e modulando a atividade do NO na musculatura lisa.(Harrison, 1997).

Os resultados de imunolocalização (Figura 9) mostraram que a distribuição subcelular da NOS presente em ápices radiculares de milho depende do estágio de diferenciação celular, sugerindo um papel para esta enzima no controle da divisão celular. Com o objetivo de dar suporte a esta idéia, a atividade NOS durante o processo de microsporogênese de café foi analisada. Botões florais ou anteras de café, que se encontravam na fase intermediária da divisão meiótica (metáfase I) apresentaram atividade da NOS de 19,20 e 9,26 pmol L-[U- ^{14}C] citrulina. $\text{h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, respectivamente, sendo que estes valores foram calculados pela diferença de citrulina produzida na ausência e na presença de L-NAME e AMG (Figura 13). As anteras foram obtidas com a remoção das pétalas que as envolvem, formando o botão floral, procedimento que causou certa oxidação do material. Este dano poderia explicar a menor atividade da NOS da antera em relação ao botão floral. Ainda, à semelhança do observado em pêlos absorventes de milho, as atividades dos extratos de café não foram bloqueadas por EGTA (Figura 13)

indicando que estes tecidos apresentam uma enzima do tipo Ca^{2+} -independente. Na Figura 14 são apresentadas as atividades das NOSs de extratos de botão floral de café que se encontravam em fases diferentes da microsporogênese, a intermediária (paquíteno) e a final (tétrade). Ambas as fases apresentaram uma alta atividade da NOS do tipo Ca^{2+} -independente. Também foi comparada a eficiência dos inibidores L-NAME e AMG, separadamente, na inibição destas atividades. Conforme observado na Figura 15, a atividade da NOS, calculada pela inibição por AMG, foi de 11,43 e 9,72 pmol L-[U- ^{14}C] citrulina $\text{h}^{-1}\text{mg}^{-1}$, nas fases de paquíteno e tétrade, respectivamente. Por outro lado, a atividade NOS calculada para estas amostras, através da inibição por L-NAME, foi 2 a 2,5 vezes menor. Estes resultados mostram que a enzima presente nos tecidos de café, durante o processo de microsporogênese, é mais sensível à AMG do que ao L-NAME, o que não é observado nos extratos de folhas jovens e ápices radiculares de milho (Figuras 10, 11 e 15). A alta atividade da NOS, a independência de Ca^{2+} e a maior sensibilidade à AMG observada nos botões florais de café, mostram que a NOS destes tecidos apresenta características similares a NOS induzível de mamíferos (Misko *et al.*, 1993, Nomura and Kitamura, 1993).

No processo de floração de café os botões florais de espécies e variedades do gênero *Coffea* crescem até um determinado tamanho, quando param de se expandir e entram em dormência, geralmente durante a estação seca. Essa dormência é quebrada por um estímulo externo, geralmente a água, causando o florescimento simultâneo de todos os botões. Citologicamente, o crescimento dos botões cessa antes da divisão meiótica ter iniciado nas células mães do grão-de-pólen. No botão em dormência as células mães do pólen já estão formadas, porém, só com o repentino aumento da disponibilidade de água ocorre o disparo sincronizado na divisão meiótica, culminando

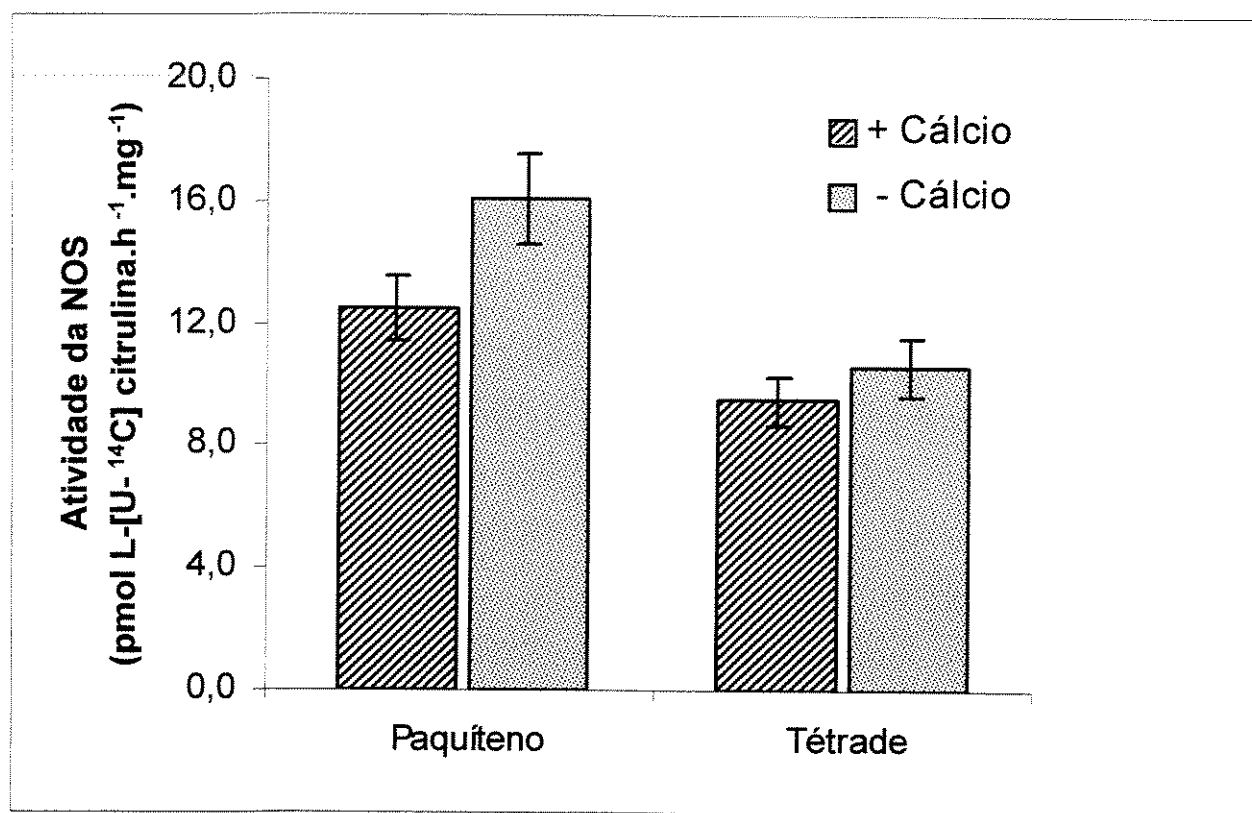


Figura 14 - **Atividade da NOS Ca^{2+} -independente nas diferentes fases da microsporogênese de café.** A atividade da NOS foi calculada na presença de aminoguanidina (3 mM). A reação foi incubada durante 30 min a 25°C. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de dois experimentos com duas repetições cada e duplicata.

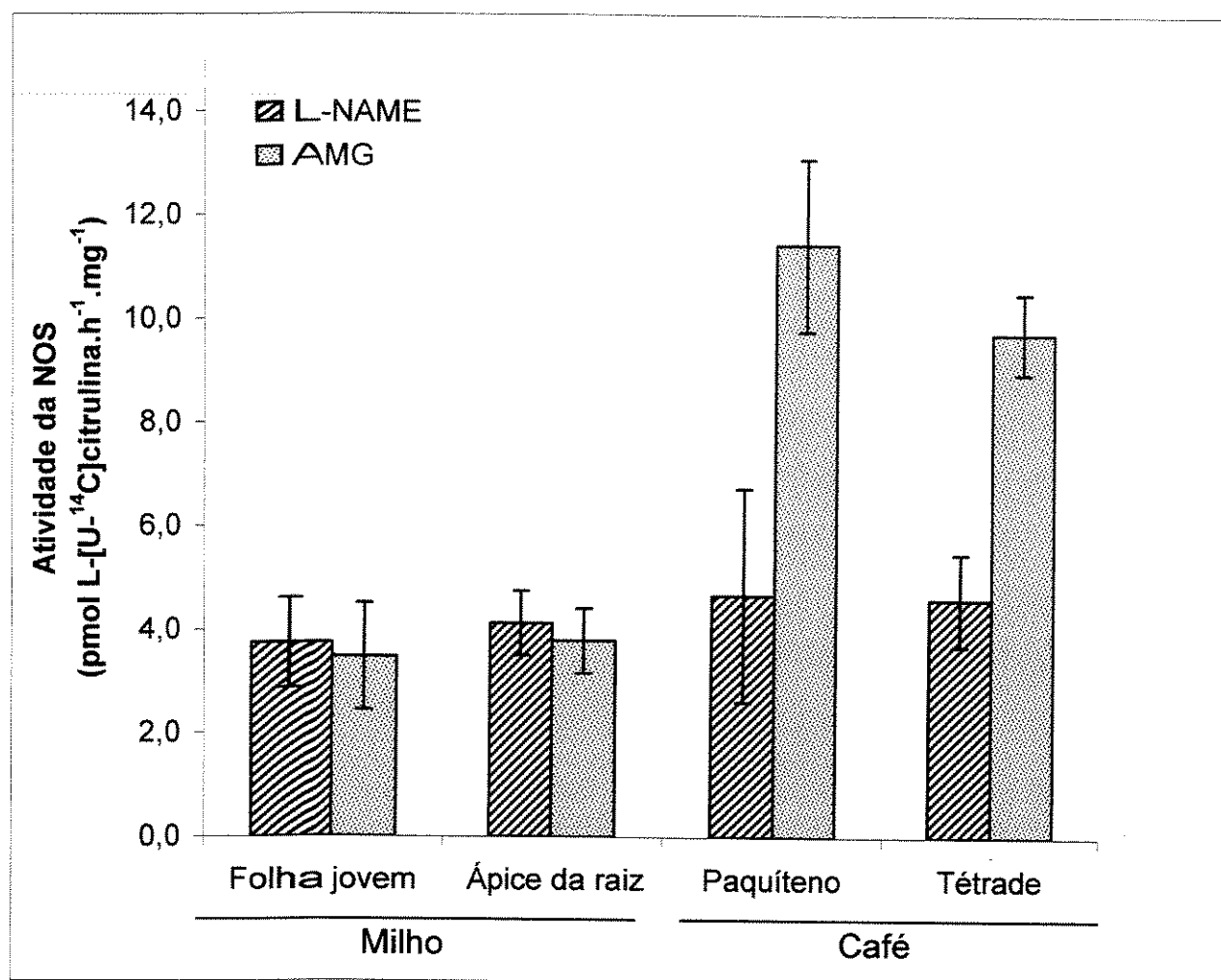


Figura 15 – **Sensibilidade diferencial de milho e café aos inibidores da NOS.** A reação foi incubada durante 30 min a 25°C e cada valor representa a diferença entre a produção de L-[U-¹⁴C]citrulina na ausência e na presença dos inibidores da NOS na concentração de 3 mM. Os resultados representam a média ± erro padrão de 2-3 experimentos com duas repetições cada e duplicata.

com a formação do pólen e a floração (Chinnappa, 1969; Barros *et al.*, 1978). Uma hipótese que poderia ser considerada é que o estímulo externo que leva ao disparo da floração de café provocaria a indução da expressão de uma enzima do tipo NOS, Ca^{2+} -independente e o NO produzido sinalizaria as células mães do grão-de-pólen a entrarem em meiose. Embora as isoformas induzíveis de NOS atuem principalmente em processos patológicos, por produzirem altas quantidades de NO, os efeitos citotóxicos deste radical também dependem de sua produção por longos períodos de tempo. A exemplo, nos processos de neurodegeneração aguda e crônica e no ataque epiléptico ocorre um descontrole da produção de NO nos tecidos neuronais (Bredt and Snyder, 1994, Garthwaite and Boulton, 1995). Estas situações mostram que, os efeitos citotóxicos deste radical são mais dependentes da sua concentração do que do tipo de isoforma responsável pela sua produção. Assim, os efeitos citotóxicos do NO na microsporogênese de café seriam prevenidos devido à rapidez com que este processo ocorre.

5. CONCLUSÕES

Os tecidos de milho apresentam atividade NOS e contêm uma proteína de aproximadamente 166 kDa, que é reconhecida por anticorpos produzidos contra NOS de origem animal. A imunoreatividade, a distribuição subcelular e a dependência de Ca^{2+} para a atividade NOS nestes tecidos varia conforme o estágio de diferenciação celular. Uma proteína imunoreativa para NOS também é detectada em células meristemáticas de laranja cultivadas *in vitro*. Ainda, atividade NOS do tipo Ca^{2+} -independente, é observada em botões florais de café, contendo as células mães do grão-de-pólen em processo de divisão meiótica.

O conjunto de resultados mostra a existência de uma enzima do tipo NOS em vegetais, com características que variam conforme o tecido, a espécie e o estágio de diferenciação celular. Adicionalmente, os resultados permitem inferir a participação do NO como molécula sinalizadora no processo de crescimento e diferenciação de tecidos de milho e na microsporogênese de café.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoki, H., Doyama, N. and Ida S. (1994) Sequence of a cDNA encoding rice (*Oryza sativa* L.) leaf ferredoxin- NADP⁺ reductase. *Plant Physiol.* **104**: 1473-1474.
- Baluska, F., Barlow, P. W. and Kubica, S. (1994) Importance of the pos-mitotic isodiametric growth (PIG) region for growth and development of roots. *Plant Soil* **167**: 31-42.
- Barros, R.S., Maestri, M. and Coons, M.P. (1978) The physiology of flowering in coffee: A review. *J. Coffee Res.* **8**: 29-73.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1620-1624.
- Beckman, J. S. and Koppenol, W. H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* **271**: C1424-C1437.
- Bradley, D. I., Kielbaso, P. and Lamb, C. (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1990) Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 682-685.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1994) Nitric oxide- A physiological messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 175-195.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H. and Chua, N.-H. (1994) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**: 73-81.
- Caro, A. and Puntarulo, S. (1998) Nitric oxide decreases superoxide anion generation by microsomes from soybean embryonic axes. *Physiol. Plantarum* **104**: 357-364.

- Chen, Y and Rosazza, J. P. N. (1995) Purification and characterization of nitric oxide synthase (NOS_{noc}) from a *Nocardia* Species. *Journal of Bacteriology* **177** (17): 5122-5128.
- Chinnappa, C.C. (1969). Observations on the effect of moisture on microsporogenesis in coffee. *The Journal of the Indian Botanical Society* Vol XLVIII: 1-2.
- Choi J. W., Haigh, W.G. and Lee, S. P. (1998) Caveat: mycoplasma arginine deiminase masquerading as nitric oxide synthase in cell cultures. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1404** (3): 314-320.
- Choi, S. K., Choi H. K., Kadono-Okuda, K., Taniai, K., Kato, Y., Yamamoto, M., Chowdhury, S., Xu J., Miyanoshita, A., Debinath, N. C., Asaoka, A. and Yamakwa, M. (1995) Occurrence of novel types of nitric oxide synthase in the silkworm, *Bombyx Mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**: 452-459.
- Christopherson, K. S. and Bredt, D. S. (1997) Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *J. Clin. Invest.* **100** (10): 2424-2429.
- Colasanti, M., Lauro, G. M. and Venturini, G. (1995) NO in hydra feeding response. *Nature* **374**: 505.
- Clark, R. A., Leidal, K. G., Person, D. W. and Nauseef, W. M. (1987) NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide-generating system. *J. Biol. Chem.* **262**: 4065-4074.
- Cueto M., Hernández-Perera, O., Martín R., Bentura, M. L., Rodrigo, J., Lamas, S. and Golvano, M. P. (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.* **398**: 159-164.
- Culotta, E. and Koshland Jr., D. E. (1992) NO news is good news. *Science* **258**: 1862-1865.

- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. and Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588.
- Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, D. F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10328-10333.
- Ding, H. A., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **141**: 2407-2412.
- Erickson, R. O. and Sax, K. B. (1956) Rates of cell division and cell elongation in the growth of the primary root of *Zea mays*. *Proc. Amer. Phil. Soc.* **100**: 499-514.
- Förstermann, U., Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., Sheng H., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Nakane, M. and Murad, F. (1991) Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 1849-1857.
- Förstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E. I. and Kleinert, H. (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 1321-1332.
- Garthwaite, J. and Boulton, C. L. (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 683-706.
- Giba, Z., Grubisic, D. and Konjevic, R. (1994) The effect of electron acceptors on the phytochrome-controlled germination of *Paulownia tomentosa* seeds. *Physiol. Plantarum* **91**: 290-294.
- Glazener, J. A., Orlandi, E. W. and Baker, J. C. (1996) The active oxygen response of cells suspensions is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol.* **110**: 759-763.

- Gouvêa, C. M. C. P., Souza, J. F., Magalhães, A. C. N. and Martins I. S. (1997) NO[•] - releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* **21**: 183-187.
- Griffith, O. W. and Stuehr, D. J. (1995) Nitric oxide synthase: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 707-736.
- Gruhn, C. M. and Boyle, S. M. (1991) Biochemical and morphological effects of polyamine biosynthesis inhibitors on *Trichophyton* and *Microsporum*. *J. Med. Vet. Mycol.* **29** (2): 63-72.
- Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. (1997) Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 575-607.
- Harrison, D. G. (1997) Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* **100** (09): 2153-2157.
- Hevel, J. M., White, K. A. and Marletta, M. A. (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase identification as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* **266**: 22789-22791.
- Holstad, M., Jansson, J. and Sandler, S. (1997) Inhibition of nitric oxide formation by aminoguanidine: An attempt to prevent insulin-dependent diabetes mellitus. *Gen. Pharmac.* **29** (5): 697-700.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and 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.

- Jaffrey, S. R. and Snyder, S. H. (1996) PIN: An associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* **274**: 774-777.
- Kim, S. J., Bang, O. S., Lee, Y. S. and Kang, S. S. (1998) Production of inducible nitric oxide is required for monocytic differentiation of U937 cells induced by vitamin E-succinate. *J. Cell Sci.* **111**: 435-441.
- Klatt, P., Schmidt, K., Lehner, D., Glatter, O., Bächinger, H. P. and Mayer, B. (1995) Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO J.* **14**: 3687-3695.
- Kröncke, K.-D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. (1997) Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection- how, why, when, and where? *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **1**: 107-120.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamb, C. and Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251-275.
- Leone, A. M., Palmer, R. M. J., Knowles, R. G., Francis, P. L., Ashton, D. S. and Mocanda S. (1991) Constitutive and inducible nitric oxide synthases are L- arginine N^G - C^G - dioxygenases. *J. Biol. Chem.* **266**: 23790-23795.
- Leshem, Y. Y. (1996) Nitric oxide in biological systems. *Plant Growth Regulation* **18**: 155-159.

- Leshem, Y. Y., Wills, R. B. H. and Veng-Vaku, V. (1998) Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide ($^{\bullet}\text{NO}$)-as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **36**(11): 825-833.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. A. and Lamb, C. (1994) H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593.
- Lowenstein, C. J., Glatt, C. S., Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1992) Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contracts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6711-6715.
- Lowenstein, C. J., Alley, E. W., Raval, P., Snowman, A. M., Snyder, S. H., Russel, S. W. and Murphy, W. J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene - two upstream regions mediate induction by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9730-9734.
- Marletta, M. A. (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**: 12231-12334.
- Martín, R., Martínez - Murillo, R., Bentura, M. L., Rodrigo, J. and Galvano, M. P. (1995) Presence of the enzyme nitric oxide synthase in root nodules of lupine plants (*Lupinus albus* cv. Multolupa). *Plant Microbe Inter.* **19**: S335.
- Martínez, A. (1995) Nitric oxide synthase in invertebrates. *Histochem. J.* **27**: 770 - 776.
- Mayer, B., John, M. and Böhme, E. (1990) Purification of calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.* **227**: 215-219.

- Mayer B., John, M., Heinzel, B., Werner E. R., Wachter, H., Schultz, G. and Bohme, E. (1991) Brain nitric oxide synthase is a biopterin-and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.* **288**: 187-191.
- Mayer, B. and Hemmens, B. (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Tibs* **22**: 477-481.
- Meijer, A.H., Lopes Cardoso M.I., Voskuilen J.T., De waal A., Verpoorte R. and Hoge J.H.C. (1993) Isolation and characterization of a cDNA clone from *Catharanthus roseus* encoding NADPH:cytochrome P-450 reductase, an enzyme essential for reactions catalysed by cytochrome P-450 mono-oxygenases in plants. *Plant J.* **4**:47-60.
- Misko, T. P., Moore, W. M., Kasten. T. P., Nickols, G. A., Corbett, J. A., Tilton, R. G., McDaniel, M. L., Williamson, J. R. and Currie, M. G. (1993) Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine *Eur. J. Pharmacol.* **233**: 119-125.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-112.
- Moncada, S., Higgs, A. and Furchgott, R. (1997) XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol. Rev.* **49** (2): 137-142.
- Moro, M. A., Darley-Usmar, V. M., Goodwin, D. A., Read, N. G., Zamora-Pino, R., Feelisch, M., Radomski, M. W. and Moncada, S. (1994) Paradoxal fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 6702-6706.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**: 473-479.
- Murashige, T. and Tucker, D. P. H. (1969) Growth factor requirements of *Citrus* tissue cultures. In: Chapman, H. D. (ed.): Proc. First Int. *Citrus* Symp. Vol. **3**, 1155-1161, University of California, Riverside.

- Nathan, C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051-3064.
- Newman, B.J. and Gray J.C. (1988) Characterisation of a full-length cDNA clone for pea ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Plant Mol. Biol.* **10**:511-520.
- Ninnemann, H. and Maier, J. (1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem. and Photobiol.* **64**: 393-398.
- Nomura, Y. and Kitamura, Y. (1993) Inducible nitric oxide synthase in glial cells. *Neuroscience Research* **18**: 103-107.
- Noritake, T., Kawakita, K. and Doke, N. (1996) Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol.* **37**: 113-116.
- Pagano, P., Ito, Y., Tornheim, K., Gallop, P., Tauber, A. and Cohen, R. (1995) NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* **268**: H2274-H2280.
- Paveto, C., Pereira, C., Espinosa, J., Montagna, A. E., Faber, M., Esteva, M., Flawiá, M. M. and Torres, H. N. (1995) The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **270**: 16576-16579.
- Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* wich is more generally applicable. *Analytical Biochem.* **83**: 346-356.
- Peunova, N. and Enikolopov, G. (1995) Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* **375**: 68-73.
- Pfeiffer, S., Janistyn, B., Jessner, G., Pichorner, H. and Ebermann, R. (1994) Gaseous nitric oxide stimulates guanosine-3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) formation in spruce needles. *Phytochem.* **36**: 259-262.

- Pinto-Maglio, C.A.F. (1987) Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar Chromosomes. *Caryologia*, **40** (1-2): 7-23.
- Pollock, J. S., Förstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. H. H. W., Nakane, M. and Murad, F. (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10480-10484.
- Pollock, J. S., Klinghofer, V., Förstermann, U. and Murad, F. (1992) Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett.* **309**: 402-404.
- Radomski, M. W., Martin, J. F. and Moncada, S. (1991) Synthesis of nitric oxide by the haemocytes of the American horseshoe crab (*Limulus polyphemus*). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **334**: 129-133.
- Regulski, M. and Tully, T. (1995) Molecular and biochemical characterization of dNOS: A *Drosophila* Ca^{2+} /calmodulin-dependent of nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9072-9076.
- Rees, D. D., Cunha, F. Q., Assreuy J., Herman, A. G. and Moncada, S. (1995) Sequential induction of nitric oxide synthase by *Corynebacterium parvum* in different organs of the mouse. *British J. Pharmacol.* **114**: 689-693.
- Ribeiro, J. M. C. and Nussenzveig, R. H. (1993) Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. *FEBS Lett.* **330**: 165-168.
- Rusche, K. M., Spiering, M. M. and Marletta, M. A. (1998) Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. *Biochemistry* **37**: 15503-15512.
- Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P. (1993) Nitric-oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (15): 7240-7244.

- Schober, A., Malz, C. R., Schober, W. and Meyer, D. L. (1994) NADPH-diaphorase in the central nervous system of the larval lamprey (*Lampetra planeri*) *J. Comp. Neurol.* **345**: 94-101.
- Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., Nakane, M., Gorsky, L. D., Förstermann, U. and Murad, F. (1991) Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 365-369.
- Schmidt, H. H. H. and Walter, U. (1994) NO at work. *Cell* **78**, 919-925.
- Schubert, K. R. and Boland, M. J. (1990) The ureides. IN: *The biochemistry of plants-A comprehensive treatise. Intermediary nitrogen metabolism*. Mifflin, B. J. and Lea, P. J (Eds.). San Diego: Academic Press: **16**, 197-282.
- Springall, D. R., Riveros-Moreno, V., Buttery, L., Suburo, A., Bishop, A. E., Merrett, M. and Moncada, S. (1992) Immunological detection of nitric oxide sintase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry* **98**: 259-266.
- Stadler, J., Harbrecht, B. G., Disilvio, M., Curran, R. G., Jordan, M. L., Simmons, R. L. and Billiar, T. R. (1993) Endogenous nitric-oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenases products and interleukin 6 by rat kupffer cells. *J. Leukocyte Biol.* **53** (2): 165-172.
- Stuehr, D. J., Cho, H. J., Know, N. S., Weise, M. F. and Nathan, C. F. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7773-7777.
- Stuehr, D. J. (1997) Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 339-359.
- Szabó, C. and Ohshima, H. (1997) DNA damage indeced by peroxynitrite: Subsequent biological effects. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **1** (5): 373-385.

- Tracey, W. R., Xue, C., Klinghofer, V. Barlow, J. Pollock, J. S., Förstermann, U. and Johns, R. A. (1994) Immunochemical detection of inducible NO synthase in human lung. *Am. J. Physiol.* **266**: (Lung Cell. Mol. Physiol. 10) L 722-L 727.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**(9): 4350-4354.
- Valle, V. G. R., Souza, J. F., and Martins, I. S. (1994) Ca^{2+} - and Fe^{2+} -dependent NAD(P)H oxidation by corn root cells. IN: *XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular A-33*: 24P (Abstract).
- Vane, J. R. (1994) The croonian lecture, 1993-the endothelium-maestro of the blood-circulation. *Philos. T. Roy. Soc. Lond B.* **343** (1304): 225-246.
- Werner-Felmayer, G., Golderer, G., Werner, E. R., Gröbner, P. and Wachter, H. (1994) Pteridine biosynthesis and nitric oxide synthase in *Physarum polycephalum*. *Biochem. J.* **304**: 105-111.
- Whittle, B. J. R. (1995) Nitric oxide in physiology and pathology. *Histochem J* **27**: (10) 727-737.
- Wu, G. and Morris Jr., M. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* **336**: 1-17.
- Xie, Q. W., Whisnant, R. and Nathan, C. (1993) Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **177**: 1779-1784.
- Zielinski, B. S., Osahan, J. K., Hara, T. J., Hosseini, M. and Wong, E. (1996) Nitric oxide synthase in the olfactory mucosa of the larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*) *J. Comp. Neurol.* **365**: 18-26.

7. TRABALHOS PUBLICADOS

7.1. Comunicações em congressos

Ribeiro Jr., E. A., Tamashiro, W. M. S. C, Martins, I. S. (1998) Immunological detection of nitric oxide synthase in maize cells. International Symposium: "Biological Application of Confocal Microscopy", Belo Horizonte, MG.

Ribeiro Jr., E. A., Tamashiro, W. M. S. C, Martins, I. S. (1998) Immunoreactivity of nitric oxide synthase in plant cells. XXVII^a, Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.

Ribeiro Jr., E. A., Cunha, F. Q., Martins, I. S. (1999) Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in maize (*Zea mays* L.) Tissues. XXVIII^a, Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.

Hotta, C., Ribeiro Jr., E. A., Pinto-Maglio, C. A., Cunha, F. Q. and Martins, I. S. (1999). Expression of nitric oxide synthase during the microsporogenesis of coffee (*Coffea arabica* L.). XXVIII^a, Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.

7.2. Publicação em periódico especializado

Ribeiro Jr., E. A., Cunha, F. Q., Tamashiro, W. M. S. C., Martins, I. S. (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett.* **445**: 283-286 (cópia em anexo).

Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells

Euripedes A. Ribeiro Jr.^a, Fernando Q. Cunha^b, Wirla M.S.C. Tamashiro^c,
Ione S. Martins^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, SP 13083-970 Campinas, Brazil

^bDepartamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade Estadual de São Paulo, SP 14049-900 Ribeirão Preto, Brazil

^cDepartamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, SP 13083-970 Campinas, Brazil

Received 4 January 1999; received in revised form 20 January 1999

Abstract A protein band of approximately 166 kDa was detected in the soluble fraction of root tips and young leaves of maize seedlings, based on Western blot analysis using antibodies raised against mouse macrophage nitric oxide synthase (NOS) and rabbit brain NOS. NOS activity was present in these soluble fractions, as determined by L-[U-¹⁴C]citrulline synthesis from L-[U-¹⁴C]arginine. Immunofluorescence showed that the maize NOS protein is present in the cytosol of cells in the division zone and is translocated into the nucleus in cells in the elongation zone of maize root tips. These results indicate the existence of a NOS enzyme in maize tissues, with the localization of this protein depending on the phase of cell growth.

© 1999 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Plant nitric oxide synthase; Root growth; Immunolocalization; *Zea mays*

1. Introduction

Nitric oxide synthase (NOS) is responsible for the synthesis of nitric oxide, from the guanidine-nitrogen of L-arginine during the five-electron oxidation to L-citrulline [1,2]. Different isoforms of NOS, originally identified in the nervous, immune and cardiovascular systems of mammalian tissues [3–5], have also been detected in non-mammalian vertebrate groups, as well as in a variety of invertebrates [6], including crab [7]. The widespread presence of NOS in the animal kingdom suggests an old evolutionary pathway for this enzyme.

Plant metabolism is influenced by exogenously applied NO. The exposure of spruce needles to gaseous NO leads to a marked, rapid increase in the intracellular concentration of cGMP [8], probably through the activation of guanylyl cyclase, an important target for the physiological effects of NO in animal cells [9]. Guanylyl cyclase activation could also account for the stimulation of germination and the modified light requirement of the phytochrome-broken dormancy of *Paulownia tomentosa* seeds induced by NO donors [10]

since cGMP, the product of this enzyme, participates in the signaling pathway of phytochrome phototransduction [11]. Low concentrations of NO donors promote growth in pea foliage [12] and maize root tips [13] while higher concentrations are necessary to induce the accumulation of phytoalexin in potato tuber tissues [14].

The ability of plants to respond to NO is indicative of the presence of many molecular targets for NO or its derivatives [15,16]. Evidence for the existence of an endogenous pathway for NO synthesis in the plant kingdom has increased in recent years. NOS activity in plant cells, based on the formation of L-citrulline from L-arginine, was initially observed in extracts of the legume *Mucuna hassjoo* [17] and in lupine roots, where a NADPH-diaphorase activity was also detected [18]. NO production by a NOS-like enzyme in cultured soybean cells was recently reported, and shown to induce plant defense responses to pathogens [19]. Inducible NOS activity in resistant, but not susceptible, tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus has also been shown to activate plant defense responses [20]. Inhibitors of NO synthesis potentiated *Pseudomonas syringae* growth in *Arabidopsis thaliana* leaves [19]. These observations, and the known multifunctional actions of NO in mammalian cells [15,16], indicate that the participation of NOS is likely to be demonstrated for many cellular processes in plants. In this study, we present evidence for the existence of a NOS-like enzyme in maize cells and suggest that this molecule may be involved in the signal transduction pathway that controls root growth.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Maize seeds (*Zea mays* L., cv. Maia Normal) were germinated aseptically at 28°C in the dark, in water supplemented with 1 mM EGTA. Young leaves and root segments (5 mm) excised from 3-day-old seedlings were used in all experiments.

2.2. Preparation of soluble fractions

Maize tissue (0.5 g/ml) was homogenized in 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1 mM EDTA, 250 mM sucrose, 20 mM KCl, supplemented with 10 mM dithiothreitol, 50 µg PMSF/ml, 100 µM benzamide and 50 µM antipain. The homogenate was frozen in liquid N₂ and ground in a mortar and pestle three times. The pH of the crude extract was adjusted to 7.2 (with NaOH) and was centrifuged at 3000×g for 20 min and then at 12000×g for 15 min at 4°C. The resulting supernatant was concentrated using Centricon-10 membranes (Amicon, Beverly, MA, USA). Protein concentrations were determined by a modified Lowry procedure [21], using BSA as the standard.

2.3. Western blotting

The polypeptides in solubilized samples were separated by SDS-

*Corresponding author. Fax: (55) (19) 289-3124.
E-mail: ionesm@obelix.unicamp.br

Abbreviations: BH₄, 6(R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; BSA, bovine serum albumin; EDTA, (ethylenedinitrilo)tetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid; FITC, fluorescein isothiocyanate; FMN, flavin mononucleotide; LPS, lipopolysaccharide; NOS, nitric oxide synthase; L-NAME, N^G-nitro-L-arginine methyl ester; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate

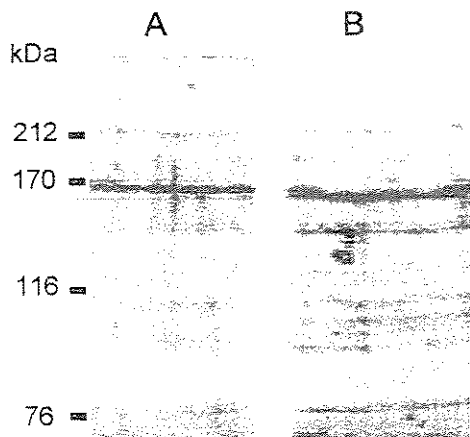


Fig. 1. Western blot analyses of extracts from maize tissues using antibodies raised against macrophage NOS. Concentrated solubilized proteins extracted from 3-day-old maize seedlings were fractionated by SDS-PAGE, blotted to nitrocellulose membranes and probed with mouse anti-macNOS antibodies. Solubilized proteins (150 μ g) from young leaves (lane A) and root tips (lane B). Molecular weight standards as follows: myosin (212 kDa), α -macroglobulin (170 kDa), β -galactosidase (116 kDa) and transferrin (76 kDa).

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to [22], using a 7% acrylamide slab gel with a 3% acrylamide stacking gel, in a Mini-Protein II Dual Slab Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The current was set at 25 mA and the gels were run for 2 h. After electrophoresis, the gels were blotted onto 0.45 μ m nitrocellulose membranes (Schleicher and Schüll, Keene, NH, USA) for 2 h, at 180 mA [23]. The membranes were then blocked by incubation for 1 h with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS: 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl) containing 0.05% Tween 20 (TBS-Tween), and then rinsed three times with TBS-Tween. The protein blots were probed with IgG_{2a} mouse anti-macNOS at 0.5 μ g/ml or polyclonal rabbit anti-brainNOS at 2 μ g/ml (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA). After overnight incubation at 4°C, the blots were washed six times with TBS-Tween for 10 min at room temperature followed by treatment with horseradish peroxidase-conjugated rabbit IgG anti-mouse Ig (for anti-macNOS) or peroxidase-conjugated sheep IgG anti-rabbit Ig (for anti-brainNOS) at 2 μ g/ml in TBS-Tween, overnight at 4°C. The blots were then washed six times

with TBS for 10 min at room temperature and the color reaction developed using 0.6 mg 3,3'-diaminobenzidine/ml (Sigma), in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 3% H₂O₂.

2.4. Immunofluorescence

Longitudinal root tip sections from maize seedlings were immersed in TMK buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.2, 50 mM mannitol, 50 mM KCl) and fixed with formalin in TMK (1:6, v/v). After 30 min, the sections were washed at least four times with TMK and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in TMK for 30 min. After washing in TMK, the sections were treated for 1 h in TMK containing 3% BSA and incubated overnight with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse IgG_{2a} anti-macNOS (10 μ g/ml; Transduction Laboratories) or with irrelevant antibody (FITC-conjugated monoclonal IgG_{2a} anti-surface protein of *Trypanosoma cruzi* prepared in our laboratory) diluted to 250 μ g/ml in TMK containing 3% BSA. Excess antibody was removed by four washes with TMK for 30 min each. The sections were then mounted in TMK containing 50% glycerol on slides covered with a coverslip and examined under a dual-channel (Bio-Rad) laser confocal system (MRC 1024UV) coupled to an Axiovert 100 inverted microscope (Zeiss) and equipped with Ar-Kr and UV lasers. The 488 nm line of the Ar-Kr laser was used to excite the FITC-labeled root tip. Manufacturer-supplied software (OS/2) running on a Pentium 150 MHz computer (Compaq) was used to control image acquisition and processing.

2.5. NOS activity

The total NOS activity in the root tips and young leaves of 3-day-old maize seedlings was determined by the citrulline assay method [24]. Briefly, 500 mg of tissue was homogenized in 0.2 ml of cooled homogenizing buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, 3.2 mM sucrose, 5 mM dithiothreitol, 10 μ g leupeptin/ml, 10 μ g soybean trypsin inhibitor/ml, and 2 μ g aprotinin/ml). The homogenate was centrifuged at 10 000 $\times$ g for 20 min at 4°C. 40 μ l of the resulting supernatant was added to 100 μ l of assay buffer (KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.2, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 50 mM valine, 20 μ M L-citrulline, 60 μ M L-arginine, 1 mM dithiothreitol, 100 μ M NADPH, 50 μ M BH₄, 4 μ M FMN, 3.5 μ g calmodulin/ml and 1 μ M (0.05 μ Ci) L-[U-¹⁴C]arginine. Following a 30 min incubation at 25°C, the reaction was terminated by adding 1:1 (v/v) suspension of Milli-Q water: Dowex-Ag50W (200–400, 8% cross-linked, Na⁺ form). The resin was removed by centrifugation (5000 $\times$ g, 10 min) and the supernatant collected. NOS activity in the supernatant was assayed by the conversion of L-[U-¹⁴C]arginine to L-[U-¹⁴C]citrulline in samples with and without the NOS inhibitors L-NAME (3 mM) and L-aminoguanidine (3 mM). The protein content of the supernatants was determined by the Coomassie blue binding method using Bio-Rad protein reagent with BSA as the standard.

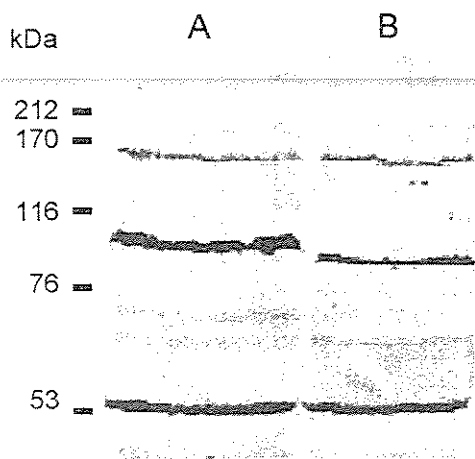


Fig. 2. Immunoreactivity of maize proteins with brain NOS antibodies. Concentrated solubilized proteins extracted from 3-day-old maize seedlings were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and probed with rabbit anti-brainNOS antibodies. Solubilized proteins (150 μ g) from young leaves (lane A) and root tips (lane B). Molecular weight standards as in Fig. 1 including glutamic dehydrogenase (53 kDa).

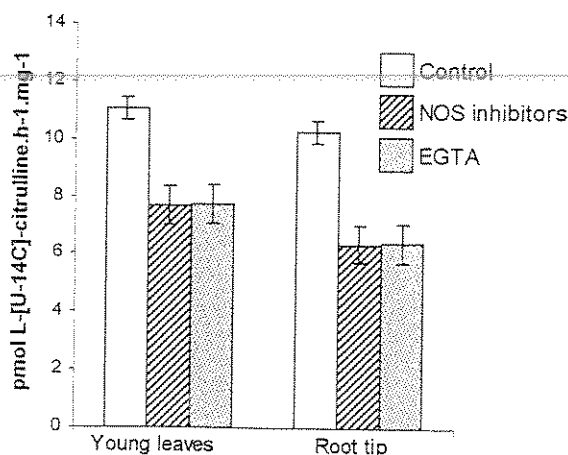


Fig. 3. NOS activity assayed by L-[U-¹⁴C]citrulline formation in maize tissues. Extracts derived from young leaves and root tips were incubated in the presence of 60 μ M L-[U-¹⁴C]arginine as described in Section 2. EGTA (2 mM) or NOS inhibitors (3 mM L-NAME and 3 mM L-aminoguanidine) were present in the reaction mixture where indicated. Data are mean values $\pm$ S.E.M. of five independent experiments.

3. Results and discussion

To identify a putative NOS enzyme in *Zea mays*, we used antibodies raised against two different mammalian NOS isoforms to perform Western blots of the soluble fractions of maize seedling homogenates. A monoclonal antibody raised against mouse macrophage NOS recognized a ~166 kDa protein in homogenates from young leaves and root tips (Fig. 1A,B). As expected, this antibody recognized the 130 kDa protein of macrophage cell extracts (not shown). Polyclonal antibodies raised against rabbit brain NOS also recognized a protein of approximately 166 kDa in soluble fractions from young maize leaves and root tips (Fig. 2A,B). This compared favorably with the expected 155 kDa NOS present in brain homogenates (not shown). Reactive polypeptides of lower molecular weight (103–109 kDa and 51 kDa) were present in plant extracts probed with anti-brainNOS (Fig. 2A,B). Since the level of these low molecular weight bands increased as the higher bands decreased, and since such bands were also seen in brain extracts allowed to age (not shown), they probably represent degradation products. Such a phenomenon has been reported previously for NOS [25].

The observation that antibodies raised against two different isoforms of mammalian NOS show cross-reactivity with the same 166 kDa protein band in maize tissues suggests the ex-

istence of a homologous NOS enzyme in this plant species with antigenic epitopes common to both mammalian isoforms. The antibodies used in the present study were raised against epitopes from the NADPH binding region of mammalian NOS. Although this region is structurally homologous to the NADPH-cytochrome P450 reductase and other plant NADPH oxidoreductases [26,27], the molecular weight of these proteins is in the range of 36–78 kDa, instead of the 166 kDa observed with maize tissues.

The 155 kDa NOS is a Ca^{2+} -dependent isoform constitutively expressed in neuronal cells while the 130 kDa NOS of macrophages is Ca^{2+} -independent, and is induced in inflammatory responses [28]. Maize tissues possessed Ca^{2+} -dependent NOS activity. As shown in Fig. 3, in the presence of 60 μM L-[^{14}C]arginine, extracts derived from young maize leaves and root tips produced 11.05 pmol and 10.26 pmol L-[^{14}C]citrulline/h/mg, respectively. When the NOS inhibitors L-NAME and L-aminoguanidine were added to the reaction mixture, both at 3 mM, these values decreased to 7.69 pmol and 6.38 pmol L-[^{14}C]citrulline/h/mg, respectively. Based on the above data the actual NOS activities estimated for young leaves and root tips were 3.36 pmol and 3.88 pmol L-[^{14}C]citrulline/h/mg, respectively. These NOS activities were completely blocked by EGTA, suggesting that a constitutive enzyme is expressed in these tissues, even though it was rec-

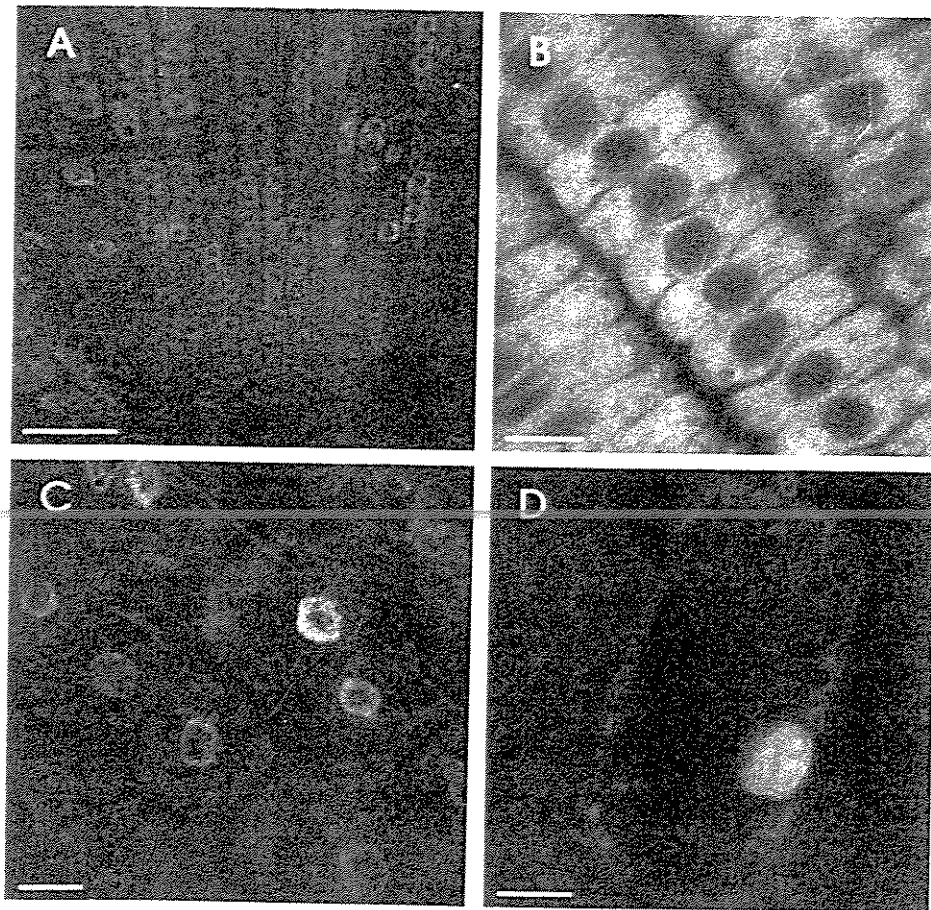


Fig. 4. Immunofluorescence of maize root tips labeled with anti-macNOS conjugated to FITC. Longitudinal sections of root tips from 3-day-old maize seedlings were immunolabeled with the fluorescent antibody and examined using a Bio-Rad 1024 UV laser scanning fluorescence confocal microscope. A and B: Sections showing intense labeling with anti-macNOS antibody in the cytoplasm of the cells in the apical meristem and subjacent meristematic tissues. C: Section of tissue in the transition between the cell division and cell elongation zones, showing labeling with anti-macNOS around the nucleus. D: Cell from the elongation zone with intense NOS immunolabeling in the nucleus. Scale bars: 50 μm for A; 10 μm for B–D.

ognized by antibodies directed against both mammalian isoforms (Figs. 1 and 2).

Plant root apices have a zone of cell division that contains the apical meristem and the subjacent meristematic tissues, followed by a zone of cell elongation. Between these two major zones there is a region characterized by the presence of postmitotic cells where the rate of cell division is decreased and rapid cell elongation has not yet been triggered [29]. We used an antibody raised against macrophage NOS conjugated with fluorescein isothiocyanate (anti-macNOS-FITC) to locate the immunoreactive protein in maize root apices. Fig. 4 shows that the cells of root tips contain considerable amounts of immunoreactive NOS protein differentially distributed in the subcellular compartments according to cell type. In the apical meristem and subjacent meristematic tissues, the immunoreactive protein was widely distributed in the cell cytoplasm and absent from the nucleus (Fig. 4A,B). As cells moved away from the cell division zone, the cytosolic immunolabeling with anti-macNOS decreased. The cells present in the transition between the zones of cell division and cell elongation showed immunolabeling to macNOS around the nucleus (Fig. 4C). The preferential nuclear localization of the immunoreactive protein was evident in cells in the elongation zone (Fig. 4D). These cells were characterized by a prominent vacuolar compartment and increased length, denoting differentiation. In control experiments where buffer alone or antibody raised against surface proteins of *Trypanosoma cruzi* conjugated with FITC replaced anti-macNOS-FITC, no fluorescence was observed in the root tip sections (not shown).

The observation that the immunoreactivity to NOS in the cytosol of meristematic cells in the division zone was displaced towards the nucleus in the elongation zone indicated that the subcellular localization of the immunoreactive NOS protein in maize roots depended on the phase of cell growth. In mammalian cells, NO has been implicated as an important mediator of the differentiation response to growth factors. NOS expression in the mitogenic phase of growth is a prerequisite for growth arrest which is necessary for further differentiation of PC12 neuronal cells induced by neuronal growth factors [30]. NO formation is also required in the early stages of the monocytic differentiation of U937 human monoblasts induced by vitamin E-succinate [31].

The subcellular distribution of NOS immunoreactive protein in the maize root apex might indicate a parallel function for this enzyme in the cellular differentiation of maize root cells. The migration of this cytosolic enzyme towards the nucleus in the elongation zone suggests the participation of this protein in the activation of nuclear transcription factors necessary to support the rapid growth of the elongation zone [32]. The possibility that NO may participate in signal transduction pathways associated with plant cell growth agrees with our previous observation on the effects of NO-releasing substances on maize root elongation [13]. In the latter study, we showed that NO-releasing compounds induced maize root growth at nanomolar concentrations. This growth was prevented by methylene blue, a compound known to inhibit NO actions,

suggesting that NO was the mediator of the observed response [13].

Acknowledgements: This research was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- [1] Marletta, M.A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 12231–12234.
- [2] Griffith, O.W. and Stuehr, D.J. (1995) *Annu. Rev. Physiol.* 57, 707–736.
- [3] Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. (1991) *Pharmacol. Rev.* 43, 109–141.
- [4] Nathan, C. (1992) *FASEB J.* 6, 3051–3061.
- [5] Snyder, S.H. (1992) *Science* 257, 494–496.
- [6] Martinez, A. (1995) *Histochem. J.* 27, 770–776.
- [7] Radomski, M.W., Martin, J.F. and Moncada, S. (1991) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B334*, 129–133.
- [8] Pfeiffer, S., Janistyn, B., Jessner, G., Pichorner, H. and Ebermann, R. (1994) *Phytochemistry* 36, 259–262.
- [9] Schmidt, H.H. and Walter, U. (1994) *Cell* 78, 919–925.
- [10] Giba, Z., Grubisic, D. and Konjevic, R. (1994) *Physiol. Plant.* 91, 290–294.
- [11] Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H. and Chua, N.-H. (1994) *Cell* 77, 73–81.
- [12] Leshem, Y.Y. and Haramaty, E. (1996) *J. Plant Physiol.* 148, 258–263.
- [13] Gouveia, C.M.C.P., Souza, J.F., Magalhães, A.C.N. and Martins, I.S. (1997) *Plant Growth Regul.* 21, 183–187.
- [14] Noritake, T., Kawakita, K. and Doke, N. (1996) *Plant Cell Physiol.* 37, 113–116.
- [15] Kröncke, K.-D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. (1997) *Nitric Oxide Biol. Chem.* 1, 107–120.
- [16] Darley-Usmar, V., Wiseman, H. and Halliwell, B. (1995) *FEBS Lett.* 369, 131–135.
- [17] Ninnemann, H. and Maier, J. (1996) *Photochem. Photobiol.* 64, 393–398.
- [18] Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J., Lamas, S. and Golvano, M.P. (1996) *FEBS Lett.* 398, 159–164.
- [19] Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1998) *Nature* 394, 585–588.
- [20] Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, D.F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10328–10333.
- [21] Peterson, G.L. (1977) *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- [22] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680–685.
- [23] Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350–4354.
- [24] Rees, D.D., Cunha, F.Q., Assreuy, J., Herman, A.G. and Moncada, S. (1995) *Br. J. Pharmacol.* 114, 689–693.
- [25] Springall, D.R., Riveros-Moreno, V., Buttery, I., Suburo, A., Bishop, A.E., Merrett, M. and Moncada, S. (1992) *Histochemistry* 98, 259–266.
- [26] Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R. and Snyder, S.H. (1991) *Nature* 351, 714–718.
- [27] Karplus, P.A., Daniels, M.J. and Herriott, J.R. (1991) *Science* 251, 60–66.
- [28] Förstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E.I. and Kleinert, H. (1995) *Biochem. Pharmacol.* 50, 1321–1332.
- [29] Baluska, F., Barlow, P.W. and Kubica, S. (1994) *Plant Soil* 167, 31–42.
- [30] Peunova, N. and Enikolopov, G. (1995) *Nature* 375, 68–73.
- [31] Kim, S.J., Bang, O.S., Lee, Y.S. and Kang, S.S. (1997) *J. Cell Sci.* 111, 435–441.
- [32] Erickson, R.O. and Sax, K.B. (1956) *Proc. Am. Phil. Soc.* 100, 499–514.