Alejandra Matiz López

Caracterização da absorção de ureia por
aquaporinas e da sua assimilação em *Vriesea*
gigantea (BROMELIACEAE)

Characterization of assimilation and aquaporin-
dependent uptake of urea in *Vriesea gigantea*
(BROMELIACEAE)

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Botânica.

Orientadora: Dra. Helenice Mercier

Co-orientadora: Dra. Marília Gaspar

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica

Matiz Lopez, Alejandra

Caracterização da absorção de ureia
por aquaporinas e da sua assimilação em
Vriesea gigantea (BROMELIACEAE)
124 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. Metabolismo de ureia 2.
Aquaporinas 3. Urease I. Universidade
de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).
Orientador(a)

DEDICATÓRIA

À minha família

Dedico

EPÍGRAFE

“Research is what I’m doing when I don’t know what I’m doing”

-Wernher von Braun

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, a Prof^a. Dr^a. Helenice Mercier pelas oportunidades que me ofereceu, todas foram de grande importância para me tornar uma pesquisadora mais madura (eu acho) ao longo destes anos de trabalho. Agradeço o apoio e motivação a cada passo no doutorado.

À minha co-orientadora a Dra. Marília Gaspar agradeço as valiosas discussões sobre as aquaporinas em plantas. Sua ajuda foi de grande importância para aperfeiçoar o desenho experimental deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Luciano Freschi e Prof. Dr. Gilberto B. Kerbauy por tentarem sempre manter a ordem no laboratório, pelos conselhos e ajuda ao longo do trabalho.

Aos meus colegas e amigos, Auri, Alininha, Aline C, Aline B, Ana Maria, Ana Z, Antônio, Bruno G (Cremoso), Bruno L (Frodo), Carol, Dêvisson, Fred, Fabito, Grilo (muito obrigada pela ajuda com a Biomol), Priscila, Renata, Rafael e Willian pelas horas de descontração e risada, por dividir a bancada e suas experiências comigo. Ao Fernando Gomes do Departamento da Genética do IBUSP por todos os ensinamentos teóricos e práticos.

Ao Perdigão por suas frases célebres que faziam a gente rir e ao Piá pelos bons momentos de convivência em casa e, sobretudo pela ajuda nas coletas, o braço firme nas horas e horas de "chuchu lyser" e por "regar-adubar" a minha bromélia de casa. A ambos, obrigada pela amizade e por serem os melhores padrinhos de casamento.

Sem dúvida este trabalho não teria sido possível sem a ajuda internacional do Prof. Dr. François Chaumont da Université Catholique de Louvain (UCL). Agradeço o interesse por querer colaborar neste trabalho, pela orientação e me mostrar a beleza da Bélgica e suas incríveis cervejas. Também agradeço aos meus colegas Nicolas Richet, Tomas, Timothée, Agnieszka, Pawel, Alicia e Bea a ajuda, as risadas e extraordinárias cervejadas belgas. A todos vocês, Santé!

Não posso deixar de agradecer a ajuda internacional do Dr. Torgny Näsholm e, particularmente, a ajuda da Dra. Sandra Jamtgård da Swedish University of Agricultural Science. Agradeço as valiosas discussões sobre o metabolismo do N, as quais foram de grande importância para a conclusão deste trabalho. Sandra, obrigada pelo exemplo de competência, profissionalismo e amor à pesquisa.

À Anikka Dalén e ao Oscar Amaya por terem me acolhido na sua casa na Suécia. Obrigada por compartilhar os segredos das gélidas terras de Umeå, os chás quentes e as conversas pós- Game of Thrones.

Aos meus amigos na Colômbia, Julián, Johannita, Camila, Vero, Juan, Karol, Ana Maria, Julián M, Gerardo e Fabio, agradeço enormemente o incentivo e motivação.

E principalmente agradeço a minha família. Aos meus pais (Jorgito e Edithsita) que sempre me incentivaram e me apoiaram incondicionalmente em me propor desafios, vocês nem imaginam o quanto importante foi para mim. A meus irmãos (Paulita e Pipito) que apesar de tudo o que me bateram na infância, não deixaram seqüelas aparentes...brincadeira. Obrigada por serem meus exemplos de dedicação e amor pelo que nos apaixona. A todos vocês obrigada pela paciência, carinho e amor, por me darem forças nos momentos difíceis e comemorarem junto comigo minhas vitórias e alegrias, mesmo à distância. E como esquecer a minha família brasileira, a meus sogros (Carlão e Regina) e cunhada (Beatriz Pinzón!) agradeço por me fazerem sentir em casa. E muito especialmente agradeço ao Paulinho, pelos sucos de laranja de manhã (vitais para o desenvolvimento deste trabalho), os mimos inesgotáveis, a ajuda incondicional, a parceria e cumplicidade em todos estes anos, e, sobretudo, por ser meu apoio nos momentos que mais precisei.

À FAPESP pela ajuda financeira, muito necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução geral.....	2
2. Referências Bibliográficas.....	6

CAPÍTULO I: Análise do transporte de ureia através de aquaporinas de *Vriesea gigantea*

1. Introdução.....	11
1.1. Aquaporinas, classificação e estrutura.....	11
1.2. Seletividade e regulação de aquaporinas em plantas.....	13
1.3. Aquaporinas e seu papel na nutrição em plantas.....	14
1.4. Aquaporinas de <i>Vriesea gigantea</i>	16
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. Material e métodos.....	18
3.1. Análise filogenética, estrutural e predição da localização celular das sequências de aquaporinas de <i>V. gigantea</i>	18
3.2. Expressão heteróloga das aquaporinas de <i>V. gigantea</i> em ovócitos de <i>Xenopus laevis</i>	18
3.3. Expressão heteróloga dos genes de aquaporinas de <i>V. gigantea</i> na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
3.4. Localização da VgTIP2 em células de tabaco.....	23
4. Resultados.....	25
4.1. Análise filogenética, estrutural e predição da localização celular das sequências protéicas deduzidas das aquaporinas de <i>V. gigantea</i>	25
4.2. Análises de permeabilidade da membrana à água, ureia e $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$	28
4.3. Localização subcelular da VgTIP2 em células de tabaco.....	33
5. Discussão.....	36
5.1. Análise filogenética e estrutural das sequências protéicas deduzidas das aquaporinas de <i>V. gigantea</i>	36
5.2. Permeabilidade da membrana à água, ureia e $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$	38
6. Referências bibliográficas.....	43

CAPÍTULO II: Análise da assimilação de ureia em plantas de *Vriesea gigantea* com baixa atividade da urease

1. Introdução.....	52
1.1. Urease, estrutura e função.....	52
1.2. Ureia e sua assimilação em plantas.....	55
1.3. <i>Vriesea gigantea</i> e o metabolismo do N.....	57
2. Objetivos.....	60
2.1. Objetivo geral.....	60
2.2. Objetivos específicos.....	60
3. Material e métodos.....	61
3.1. Material vegetal e condições experimentais.....	61
3.2. Inibição da atividade da urease por cloranil e seus efeitos no metabolismo de nitrogênio relacionado à ureia.....	63
4. Resultados.....	68
4.1. Inibição da atividade da urease em plantas de <i>V. gigantea</i>	68
4.2. Teor endógeno de ureia de plantas atmosféricas e adultas-tanque de <i>V. gigantea</i> tratadas com o inibidor da urease (cloranil).....	69
4.3. Análises do teor de amônio, proteína solúvel e do perfil de aminoácidos de plantas atmosféricas e adultas-tanque de <i>V. gigantea</i> tratadas com o inibidor da urease (cloranil).....	70
4.4. Assimilação direta de ureia em plantas de <i>V. gigantea</i>	81
5. Discussão.....	83
6. Referências bibliográficas.....	92
 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	 100
 RESUMO.....	 105
 ABSTRACT.....	 107
 ANEXOS	 109

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

Vriesea gigantea Gaudichaud é uma espécie endêmica do Brasil, de ocorrência exclusiva na região sudeste da Mata Atlântica (SAMPAIO *et al.*, 2012). É considerada uma bromélia epífita com tanque tipo III, segundo a classificação dos tipos ecológicos de formas de vida feita por PITTENDRIGH (1948). Isto é, esse tipo de bromélia caracteriza-se principalmente pela formação de uma estrutura constituída pelo imbricamento das folhas, denominada de tanque ou cisterna, que permite o acúmulo de água e material orgânico. Desta maneira, é possível a absorção de nutrientes através de estruturas presentes nas bases foliares chamadas tricomas, os quais ficam em contato com a solução ali acumulada (TOMLINSON, 1969; BENZING *et al.*, 1976; BENZING, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 2007).

As bromélias de hábito terrestre absorvem os nutrientes do solo, tendo suas raízes bem desenvolvidas; ao contrário das bromélias de hábito epífito, cujas raízes são muito reduzidas e utilizadas principalmente para a fixação à planta hospedeira (BENZING & RENFROW, 1974). Dessa forma, em plantas adultas com tanque, a folha é o seu principal órgão vegetativo (BENZING, 2000), executando tanto as funções de absorção de água e nutrientes quanto as de assimilação dos mesmos. Além disso, cabe salientar que muitas bromélias epífitas no seu desenvolvimento possuem uma conspícua mudança entre duas fases ontogenéticas (BENZING, 2000; SCHMIDT & ZOTZ, 2001): enquanto a fase juvenil possui características similares às encontradas em tilandsias atmosféricas, como a falta de tanque e folhas lineares cobertas por tricomas de absorção, a fase adulta possui características típicas de bromélias formadoras de tanque, apresentando folhas maiores cujas bases alargadas sobrepõem-se, formando cisternas de reserva de água. Como observado por SCHMIDT & ZOTZ (2001) em *Vriesea sanguinolenta* e por ADAMS & MARTIN (1986) em *Tillandsia deppeana*, essa mudança de fase ao longo da ontogenia de bromélias vem acompanhada por mudanças morfológicas, anatômicas e fisiológicas.

Por muito tempo acreditou-se que fontes inorgânicas de nitrogênio, como o NH_4^+ e o NO_3^- eram as únicas formas possíveis de absorção pelas plantas. Contudo, estudos evidenciaram que as plantas são capazes de absorver fontes orgânicas, como a ureia na sua forma intacta, ou seja, sem prévia transformação em moléculas de NH_4^+ (INSELSBACHER *et al.*, 2007; MÉRIGOUT *et al.*, 2008) e aminoácidos (INSELSBACHER *et al.*, 2007; PERSSON & NÄSHOLM, 2001; NÄSHOLM *et al.*, 2009). Além disso, a importância das fontes orgânicas de nitrogênio para nutrição vegetal tem sido continuamente demonstrada, principalmente em ambientes onde o suprimento das fontes inorgânicas é limitado (CHAPIN *et al.*, 1993; KIELLAND, 1994; SCHIMEL & CHAPIN, 1996;

LIPSON & NÄSHOLM, 2001), como acontece no habitat natural das plantas epífitas. Nesse caso, os compostos orgânicos podem constituir a maior parte dos recursos nitrogenados utilizados para a nutrição (BENZING, 2000). Parte dos compostos orgânicos podem ser transportados no ar, podendo a fração solúvel desses estar biodisponível (CAPE *et al.*, 2011; LIPSON & NÄSHLOM, 2001). Mesmo que os compostos nitrogenados orgânicos possam estar disponíveis nos ambientes epifíticos através da deposição atmosférica, é a associação com organismos (excretas de anfíbios e outros organismos) uma das principais vias de entrada de fontes de nitrogênio para as plantas epífitas (BENZING, 1990; LOPEZ *et al.*, 1999).

Estudos feitos por ROMERO *et al.* (2006 e 2008) demonstraram a importância da aranha *Psecas chapoda* (Salticidae) no abastecimento do nitrogênio para a nutrição da bromélia *Bromelia balansae*, chegando a contribuir com 18% do nitrogênio total da planta. Vários estudos têm documentado a grande capacidade que as bromélias epífitas possuem de utilizar ureia como fonte orgânica de nitrogênio. A espécie rupícula com tanque *Vriesea fosteriana* mostrou ter preferência pelo nitrogênio de origem orgânica (ureia) (NIEVOLA *et al.*, 2001). Observou-se também um melhor crescimento das espécies *V. gigantea* e *Vriesea phillipocoburgi* quando cultivadas *in vitro* na presença de ureia (MERCIER *et al.*, 1997; ENDRES & MERCIER, 2001). De forma condizente, a bromélia epífita *V. gigantea* mostrou uma alta capacidade das folhas em absorver essa fonte de nitrogênio na sua forma intacta, além de apresentar uma cinética linear de absorção onde, mesmo na presença de altas concentrações de ureia, não houve saturação do seu influxo (INSELSBACHER *et al.*, 2007).

Apesar da observação de que a ureia possui baixa solubilidade através das bicamadas lipídicas artificiais (GALLUCI *et al.*, 1971), o oposto é observado em sistemas biológicos, sugerindo o envolvimento de proteínas no transporte transmembrana da ureia (WIETH *et al.*, 1974; MAYRAND & LEVITT, 1983). A identificação de transportadores de ureia de alta afinidade (DUR3) (ELBERRY *et al.*, 1993; LIU *et al.*, 2003a) e de baixa afinidade (aquaporinas) (LIU *et al.*, 2003b; GASPAR *et al.*, 2003), trouxe novas informações sobre a base molecular do transporte dessa fonte nitrogenada. Atuando em conjunto, esses transportadores permitem otimizar a nutrição nitrogenada da planta, atuando de maneira dependente das quantidades disponíveis de nitrogênio (KRAJEWSKA, 2009).

Ainda que o termo aquaporina tenha sido inicialmente restrito para proteínas transportadoras de água (CARBREY & AGRE, 2009), atualmente o termo tem sido empregado num sentido mais amplo, referindo-se a todos os tipos de MIPs (proteínas intrínsecas de membrana), as quais participam de inúmeras funções ao longo do desenvolvimento da planta, da

sua nutrição e de processos de adaptação em resposta às condições variáveis do ambiente (MAUREL, 2007). Apesar de inicialmente se acreditar que as aquaporinas participariam exclusivamente do transporte de água, estudos funcionais de expressão em ovócitos de *Xenopus laevis* demonstraram a capacidade de algumas isoformas de aquaporinas transportarem, também, solutos neutros de pequeno tamanho, como ureia (GERBEAU *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2003b; GASPAR *et al.*, 2003; KOJIMA *et al.*, 2006), glicerol (GERBEAU *et al.*, 1999), ácido bórico (TAKANO *et al.*, 2006), e outros (MAUREL *et al.*, 2008).

Um dos primeiros indícios sobre a relação das aquaporinas com o metabolismo do nitrogênio foi a demonstração da capacidade das aquaporinas transportarem ureia (LIU *et al.*, 2003b; GASPAR *et al.*, 2003) e amônia, juntamente com estudos que evidenciaram, de maneira dependente, a expressão de algumas isoformas de aquaporinas na presença de compostos nitrogenados, como, por exemplo, para o gene *ZmPIP1;5b* de milho, o qual foi altamente induzido na presença de nitrato (GASPAR *et al.*, 2003) e para o gene *AtTIP2;1*, de *Arabidopsis*, o qual foi fortemente induzido na presença de amônio (LOQUÉ *et al.*, 2005). Dessa maneira, as aquaporinas têm funções muito importantes no transporte e equilíbrio de compostos nitrogenados dentro da célula.

Como descrito anteriormente, a bromélia epífita *V. gigantea* possui uma alta capacidade de absorver ureia. Aparentemente, esse processo é mediado por transportadores protéicos do tipo aquaporina, uma vez que o inibidor HgCl_2 , capaz de se ligar nos resíduos de cisteínas da região do poro das aquaporinas, reduziu em 78% a absorção de ureia (INSELSBACHER *et al.*, 2007). Além disso, em estudos feitos no nosso laboratório, foram clonados três genes de aquaporinas, *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* e *VgTIP2* de plantas de *V. gigantea* crescidas *in vitro* e tratadas com ureia (CAMBUÍ, 2009). Entretanto, a capacidade dessas aquaporinas em transportar ureia, amônia ou água não tinha sido determinada até o momento.

Uma vez que a ureia entra na célula vegetal (através de transportadores específicos) ou é gerada como subproduto em processos metabólicos, como a degradação de aminoácidos, esta pode ser metabolizada rapidamente ou, então, ser acumulada em tecidos-fonte como folhas senescentes, nos quais o nitrogênio é remobilizado para sustentar o crescimento (POLACCO & HOLLAND, 1993). Em tecidos não senescentes, a ureia praticamente não se acumula (WINKLER, 1988), sendo necessária sua assimilação. Para tanto, a ureia é hidrolisada pela ação da enzima urease produzindo CO_2 e amônio. O amônio é assimilado principalmente pela ação combinada das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (MARSCHNER, 1995; LAM *et*

al., 1996). Aparentemente, o CO₂ também é aproveitado, parte dele sendo assimilado em moléculas de malato (MATIZ *et al.*, 2017).

Em plantas adultas de *V. gigantea*, foi possível observar que quando fornecida a ureia no interior do tanque, a região apical da folha desempenha, preferencialmente, a assimilação do nitrogênio (devido às altas atividades das enzimas GS e GDH encontradas nesta região), enquanto que a basal realiza a hidrólise da ureia (dada a elevada atividade da urease nessa porção foliar)(TAKAHASHI & MERCIER, 2011). Mais ainda, as raízes das plantas na fase atmosférica demonstraram ser funcionais em termos enzimáticos e de absorção de ureia, processo hoje em dia muito pouco estudado nas bromélias epífitas. Considerando a alta eficiência de absorção que possui *V. gigantea*, desconhecem-se as dinâmicas de assimilação do nitrogênio proveniente da ureia em uma condição de baixa atividade da urease e a relevância desta enzima nas diferentes fases ontogenéticas e órgãos vegetativos (folha e raiz).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W.W & MARTIN, C.E. (1986). Physiological consequences of changes in life form of the Mexican epiphyte *Tillandsia deppeana* (Bromeliaceae). *Oecologia*. 70: 298–304.
- BENZING, D. H. & RENFROW, A. (1974). The mineral nutrition of Bromeliaceae. *Botanical Gazette*. 135: 281-288.
- BENZING, D. H.; HENDERSON, K.; KESSEL, B.; SULAK, J. (1976). The absorptive capacities of bromeliad trichomes. *Am. J. Bot.* 63: 1009- 1014.
- BENZING, D.H. (1990). Vascular epiphytes, general biology and related biota. Ashton P.S. Cambridge, *Cambridge University Press*. UK.
- BENZING, D.H. (2000). Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge, *Cambridge University Press*. UK.
- CAMBUÍ, C.A. (2009). Absorção e assimilação de uréia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*. Tese. Instituto de Biociências IBUSP. São Paulo. Brasil.
- CAPE, J.N., CORNELL, S.E., JICKELLS, T.D., NEMITZ, E. (2011). Organic nitrogen in the atmosphere — Where does it come from? A review of sources and methods. *Atmos. Res.* 102: 30–48.
- CARBREY, J.M; AGRE, P. (2009). Discovery of the aquaporins and development of the field. *Aquaporins, Handbook of Experimental Pharmacology*, 190: 3-28.
- CHAPIN, F.S.III.; MOILAINEN, L.; KIELLAND, K. (1993). Preferential use of organic nitrogen by a nonmicorrhizal arctic sedge. *Nature*, 361:150-153.
- ELBERRY, H.M., MAJUMDAR, M.L., CUNNINGHAM, T.S., SUMRADA, R.A., COOPER, T.G. (1993). Regulation of the urea active transporter gene (DUR3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 175(15):4688-4698.
- ENDRES, L. & MERCIER, H. (2001). Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *J. Plant. Nutr.* 24(1): 29-42.
- GALLUCI, E.; MICELLI, C.; LIPPE, C. (1971). Non-electrolyte permeability across thin lipid membranes. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 79: 881–887.
- GASPAR, M.; BOUSSER, A.; SISOËFF, I.; ROCHE, O.; HOARAU, J.; MAHE, A. (2003). Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporin transporting water and urea. *Plant. Sci.* 165: 21-31.
- GERBEAU, P.; GÜCLÜ, J.; RIPOCHE, P.; MAUREL, C. (1999). Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J.* 18: 577–587.
- INSELSBACHER, E.; CAMBUÍ, C. A.; RICHTER, A.; STANGE, C. F.; MERCIER, H.; WANEK, W. (2007). Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytol.* 175(2): 311-320.

- KIELLAND, K. (1994). Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecology*, 75(8): 2373-2383.
- KOJIMA, S.; BOHNER, A.; VON WIRÉN, N. (2006). Molecular mechanisms of urea transport in plants. *J. Membrane. Biol.* 212: 83–91.
- KRAJEWSKA, J. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J. Mol. Catal. B-Enzym*, 59: 9-21.
- LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G.M. (1996). The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:569-593.
- LIPSON, D.; NÄSHOLM, T. (2001). The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. *Oecologia*. 128: 305–316.
- LIU, L. H.; LUDEWIG, U.; FROMMER, W. B.; VON WIRÉN, N. (2003a). AtDUR3 Encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 15: 790-800.
- LIU, L.H.; LUDEWIG, U.; GASSERT, B.; FROMMER, W.B.; VON WIRÉN, N.(2003b). Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis. *Plant. Physiol.* 133:1220–28.
- LOPEZ, L. C. S.; RODRIGUES, P. J. F. P.; RIOS, R. I. (1999). Frogs and snakes as phoretic dispersal agents of bromeliad ostracods (Limnocytheridae: Elpidium) and annelids (Naididae: Dero). *Biotropica*. 31: 705-708.
- LOQUÉ, D.; LUDEWIG, U.; YUAN, L.; VON WIRÉN, N. (2005). Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiology*, 137:671–80.
- MARSCHNER, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic Press London.
- MATIZ, A.; MIOTO, P.T.; AIDAR, M.P.M.; MERCIER, H. (2017). Utilization of urea by leaves of bromeliad *Vriesea gigantea* under water deficit: much more than a nitrogen source. *Biol. Plantarum*. doi:10.1007/s10535-017-0721-z.
- MAUREL, C. (2007). Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letters*, 581: 2227–2236.
- MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D.-T.; SANTONI, V. (2008). Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:595–624.
- MAYRAND, R.R., LEVITT, D.G. (1983). Urea and ethylene glycol-facilitated transport systems in the human red cell membrane. *J. Gen. Physiol.* 81: 221-237.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.; SOTTA, B.; MIGINIAC, E. (1997). Effects of NO₃⁻, NH₄⁺ and urea nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. *Plant. Cell. Environ.* 20(3): 387-392.
- MÉRIGOUT, P.; LELANDAIS, M.; BITTON, F.; RENOU, J.-P.; BRIAND, X.; MEYER, C.; DANIEL-VEDELE, F. (2008). Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* 147: 1225–1238.

- NÄSHOLM, T.; KIELLAND, K.; GANETEG, U. (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol.* 182: 31–48.
- NIEVOLA, C. C.; MERCIER, H.; MAJEROWICZ, N. (2001). Uréia: uma possível fonte de nitrogênio orgânico para as bromélias com tanque. *Bromélia*. 3: 44-48.
- PERSSON, J.; NÄSHOLM, T. (2001). Amino acid uptake: a widespread ability among boreal forest plants. *Ecol. Lett.* 4: 434-438.
- PITTENDRIGH, C. S. (1948). The bromeliad-Anopheles-malaria complex in Trinidad. I-The bromeliad flora. *Evolution*, 2: 58-89. Em: Lüttge, U. (1989). Vascular plants as epiphytes. *Evolution and Ecophysiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 112-115. Germany.
- POLACCO, J.C.; HOLLAND, M.A. (1993). Roles of urease in plant cells, *Int. Rev. Cytol.* 145: 65–103.
- ROMERO, G. Q.; MAZZAFERA, P.; VASCONCELLOS-NETO, J.; TRIVELIN, P. C. O. (2006). Bromeliad-living spiders improve host plant nutrition and growth. *Ecology*. 87(4): 803-808.
- ROMERO, G. Q.; VASCONCELLOS-NETO, J.; TRIVELIN, P. C. O. (2008). Spatial variation in the strength of mutualism between a jumping spider and a terrestrial bromeliad: Evidence from the stable isotope ^{15}N . *Acta Oecologica*, 33(3): 380–386.
- SAMPAIO, J. A. T.; ZANELLA, C. M.; GOETZE, M.; PAGGI, G. M.; BRUXEL, M.; BÜTTOW, M. V.; BERED, F.; PALMA-SILVA, C. (2012). Inbreeding depression in *Vriesea gigantea*, a perennial bromeliad from southern Brazil. *Bot. J. Linn. Soc.* 169: 312–319.
- SCHIMEL, J.P.; CHAPIN, F.S.III. (1996). Tundra plant uptake of amino acid and NH_4^+ nitrogen in situ: Plants compete well for amino acid N. *Ecology*, 77: 2141-2147.
- SCHMIDT, G & ZOTZ, G. (2001). Ecophysiological consequences of differences in plant size: in situ carbon gain and water relations of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. *Plant. Cell. Environ.* 24: 101–111.
- TAKAHASHI, C. A.; CECCANTINI, G. C. T.; MERCIER, H. (2007). Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19 (2): 119-126.
- TAKAHASHI, C.A. & MERCIER, H. (2011). Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *J. Plant. Physiol.* 168: 1208-1216.
- TAKANO, J.; WADA, M.; LUDEWIG, U.; SCHAAF, G.; VON WIRÉN, N.; FUJIWARA, T. (2006). The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell*. 18:1498–509.
- TOMLINSON, P. B. (1969). Anatomy of monocotyledons. iii Commelinales- Zingiberales. *Oxford University Press*. Em: Lüttge, U. (1989). Vascular plants as epiphytes. *Evolution and Ecophysiology*. Ed Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 112-115. Germany.
- WIETH, J. O.; FUNDER, J.; GUNN, R. B.; BRAHM, J. (1974). Passive transport pathways for chloride and urea through the red cell membrane. In: *Comparative Biochemistry and Physiology of Transport*. Bolis, K., Bloch, K., Luria, S.E., Lynen, F., eds. pp. 317–337. Elsevier/North- Holland, Amsterdam

WINKLER, R.G.; BLEVINS, D.G.; POLACCO, J.C.; RANDALL, D.D. (1988). Ureide catabolism in nitrogen-fixing legumes. *Trends Biochemical Science*, 13:97-100.

CAPÍTULO I

ANÁLISE DO TRANSPORTE DE UREIA ATRAVÉS DE AQUAPORINAS DE *Vriesea gigantea*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aquaporinas, classificação e estrutura

Aquaporinas são proteínas canal que permitem a passagem bidirecional de água e solutos não carregados de baixa massa molecular através da membrana (AGRE *et al.*, 1993). A entrada seletiva de água se dá na direção de um gradiente osmótico, e a de solutos segue um gradiente de concentração. Por essa razão, o transporte de água e solutos é independente de uma fonte externa de energia como o ATP, fazendo destes canais transportadores passivos (CHRISPEELS & MAUREL, 1994; MAUREL, 1997).

As aquaporinas estão classificadas dentro da superfamília de MIPs (proteínas intrínsecas de membrana) presente em arqueobactérias, bactérias, protozoários, leveduras, plantas e animais. Em plantas, segundo a similaridade na sequência de aminoácidos e localização subcelular, as aquaporinas são classificadas em sete diferentes subfamílias (WANG *et al.*, 2016). As mais abundantes nas membranas plasmáticas e de tonoplasto são as PIPs (proteínas intrínsecas de membrana plasmática) e TIPs (proteínas intrínsecas de tonoplasto), respectivamente (MAUREL *et al.*, 2009); as NIPs (proteínas intrínsecas do tipo nodulina 26) estão na membrana plasmática de várias espécies (WALLACE *et al.*, 2006), entretanto, foram identificadas inicialmente na membrana peribacteriote de nódulos simbióticos fixadores de nitrogênio em soja, sendo a primeira MIP identificada em plantas (SANDAL & MARCKER, 1988); as SIPs (proteínas intrínsecas pequenas básicas) estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático; as XIPs (proteínas intrínsecas X) estão presentes em dicotiledôneas mas não foram identificadas em monocotiledôneas (BIENERT *et al.*, 2011) e as HIPs (proteínas intrínsecas híbridas) e GIPs (proteínas intrínsecas do tipo GlpF) estão presentes unicamente em musgos (DANIELSON & JOHANSON, 2008).

Em eucariotos, devido a eventos de duplicação gênica, as subfamílias de aquaporinas diversificaram suas funções. Em plantas existe um alto número de aquaporinas descritas para uma mesma espécie, por exemplo, 35 em milho (CHAUMONT *et al.*, 2001) ou 39 em arroz (SAKURAI *et al.*, 2005), em comparação com animais (9 em humanos- DAY *et al.*, 2014). Acredita-se que isso se deva a vários eventos de duplicação do genoma inteiro ao longo da evolução das plantas (ABASCAL *et al.*, 2014), fazendo com que as subfamílias de aquaporinas diversificassem suas funções de transporte, mecanismos regulatórios e expressão (ABASCAL *et al.*, 2014). Atualmente, de mais de 15 espécies de plantas das quais já foram identificados genes

de aquaporinas, apenas duas estruturas de aquaporinas em plantas são conhecidas por cristalografia, a SoPIP2;1 de *Spinacia oleracea* (TÖRNROTH-HORSEFIELD *et al.*, 2006; FRICK *et al.*, 2013) e a AtTIP2;1 em *Arabidopsis thaliana* (KIRSCHT *et al.*, 2016).

A estrutura das aquaporinas está constituída por seis α -hélices transmembrana, três alças extracelulares e duas intracelulares, com os domínios N- e C- terminal citoplasmáticos (**Figura I.1**). Dois motivos conservados de aminoácidos, asparagina-prolina-alanina (NPA), localizados na primeira alça citoplasmática e na terceira alça extracelular, se dobram e se inserem no centro da membrana, contribuindo para a formação do canal. Além dos motivos NPA, o motivo ar/R (aromático/arginina) forma a região mais estreita do canal (pelo menos em aquaporinas ortodoxas- aquelas que transportam predominantemente água) e é formado por 4 resíduos de aminoácidos, os quais são um dos principais filtros de exclusão por tamanho e de formação de pontes de hidrogênio para o efetivo transporte do substrato (CARBREY & AGRE, 2009; TÖRNROTH-HORSEFIEL *et al.*, 2010; CHAUMONT & TYERMAN, 2014).

Figura I-1: Esquema representativo da estrutura de uma aquaporina. Destacam-se as 6 α -hélices transmembrana (TM1-TM6), as duas α -hélices curtas das alças B e E (HB e HE) contendo os motivos NPA, as 3 alças extracelulares (A, C e E) e as duas intracelulares (B e D), assim como, o N- e C-terminal voltados para a região citoplasmática. As estrelas vermelhas representam os 4 resíduos que conformam o filtro de seleção ar/R. A letra R representa o resíduo de arginina invariável do filtro ar/R. Figura modificada de CHAUMONT *et al.*, 2001.

As aquaporinas se dobram formando monômeros em forma de "ampulheta", estrutura que é conservada em todas as aquaporinas até hoje descritas (TÖRNROTH-HORSEFIELD *et al.*, 2006; FRICK *et al.*, 2013; KIRSCHT *et al.*, 2016). Entretanto, em sistemas *in vivo*, os monômeros se organizam em homo- ou hetero-tetrâmeros que atuam como unidades transportadoras

independentes (JUNG *et al.*, 1994). A estrutura quaternária formada pelos tetrâmeros é estabilizada através das interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio entre as α -hélices dos monômeros, além da interação com lipídeos e surfactantes (FU *et al.*, 2000; SUI *et al.*, 2001). Adicionalmente, a associação dos quatro monômeros cria um canal central adicional, o qual, pelo seu caráter hidrofóbico não permite a entrada de água nem solutos neutros, contudo, parece ser permeável a íons (em humanos) ou CO₂ em plantas (UEHLEIN *et al.*, 2008; OTTO *et al.*, 2010), embora este aspecto ainda seja controverso.

1.2. Seletividade e regulação de aquaporinas em plantas

Os filtros de seleção NPA e ar/R têm sido amplamente discutidos na literatura como pontos chave na seletividade das aquaporinas (FROGER *et al.*, 1998; FU *et al.*, 2000; SUI *et al.*, 2001; SAVAGE *et al.*, 2003; HOVE & BHAVE, 2011), entretanto, não são os únicos pontos de controle. Em termos estruturais, o diâmetro do canal, as características químicas dos resíduos do poro e dos vestibulos (regiões ao redor dos motivos NPA) e o controle do *gating* (abertura e fechamento do canal) por pH, ligação de cátions divalentes (provavelmente Ca²⁺), fosforilação dos resíduos de serina (Ser115) na alça B, são pontos importantes na seletividade e atividade das aquaporinas (TÖRNROTH-HORSEFIELD *et al.*, 2006; FRICK *et al.*, 2013). Adicionalmente, a parte N-terminal da proteína, parece estar envolvida no fechamento do canal através da interação dos resíduos tirosina (Tyr31) com os resíduos de glicina (Gly) localizados perto do poro (FISCHER *et al.*, 2009), assim como a alça D parece ser sensível a mudanças de pH que leva à protonação dos seus resíduos de histidina causando o fechamento de poro (TÖRNROTH-HORSEFIELD *et al.*, 2006). De igual maneira, o comprimento e movimento das alças citoplasmáticas, a homo- (DANIELS *et al.*, 1999; KUKULSKI *et al.*, 2005) ou heterotetramerização (FETTER *et al.*, 2004; ZELAZNY *et al.*, 2007) e tráfego para a membrana (BESSERER *et al.*, 2012) são pontos que regulam a atividade das aquaporinas. Em plantas, a heterotetramerização parece ser de grande importância para a regulação da permeabilidade das MIPs, particularmente as PIPs. Esta subfamília de MIPs está dividida em duas subclasses (as isoformas PIP1 e as PIP2) que diferem principalmente nas sequências N- e C- terminal, assim como na alça A. A alça A é necessária para o correto tráfego das PIP1s para a membrana (via heterotetramerização) e dessa maneira, serem capazes de realizar o transporte de água (FETTER *et al.*, 2004; BIENERT *et al.*, 2012; JOZEFKOWICZ *et al.*, 2013).

Visando prever a seletividade do canal das aquaporinas usando apenas as sequências primárias, FROGER e colaboradores (1998), através do alinhamento de sequências de aquaporinas e programas estatísticos, identificaram 5 resíduos (P1-P5) localizados nas alças C e

E e na sexta hélice transmembrana capazes de diferenciar aquaporinas ortodoxas (específicas no transporte de água) das aquagliceroporinas (transportadoras de solutos pequenos como o glicerol). Posteriormente, HOVE e BHAVE (2011), baseados em alinhamentos de aquaporinas não ortodoxas e cuja permeabilidade aos substratos (amônia, boro, CO₂, H₂O₂, silício e ureia) já foi identificada através de ensaios funcionais, estabeleceram posições determinantes de especificidade (SDPs), sugerindo possíveis assinaturas nas sequências nos sítios de seletividade primária das MIPs (sequências perto dos motivos NPA, o filtro ar/R e os motivos P1-P5) para cada soluto, de modo a prever *in silico* a especificidade da aquaporina.

Contudo, apesar das abordagens *in silico* para melhorar a precisão da predição dos solutos transportados pelas aquaporinas, ainda são necessários estudos funcionais para comprovar a seletividade, conhecer a regulação e os parâmetros cinéticos de permeação das aquaporinas. Dessa maneira, para a realização de estudos funcionais são empregadas várias abordagens, como o uso de tecidos, organelas, protoplastos ou vesículas de membrana isoladas de organismos (UEHLEIN *et al.*, 2003; NORONHA *et al.*, 2014; BESSERER *et al.*, 2012; NIEMIETZ & TYERMAN, 1997), lipossomas (VERDOUCQ *et al.*, 2008) ou o sistema heterólogo de ovócitos de *Xenopus laevis*, amplamente utilizado hoje em dia.

1.3. Aquaporinas e seu papel na nutrição em plantas

Algumas das primeiras aquaporinas identificadas em plantas foram descritas como proteínas induzidas por estresse hídrico (HÖFTE *et al.*, 1992) e somente algum tempo depois foram caracterizadas funcionalmente como canais permeáveis à água. À luz dessa descoberta, as aquaporinas foram associadas a vários processos fisiológicos em plantas, como no alongamento celular, movimento estomático, germinação e participação em respostas a estresses abióticos como anoxia, alta salinidade e déficit hídrico (CHAUMONT & TYERMAN, 2014; LI *et al.*, 2014; REDDY *et al.*, 2015). Entretanto, as interações entre as MIPs e a nutrição de plantas permanecem pouco conhecidas.

Existe uma forte relação entre os nutrientes e o balanço hídrico da planta, sendo a absorção de nutrientes acompanhada pela entrada de água. Em plantas, foi visto que o fósforo (P) e o potássio são capazes de alterar a expressão e atividade das aquaporinas para manter o balanço osmótico e o turgor celular (CARVAJAL *et al.*, 1996; CLARKSON *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2006). Além disso, já foi comprovado o transporte de boro (um micronutriente essencial para a estrutura e formação da parede celular) (TAKANO *et al.*, 2002; 2006; 2008) e silício (MA *et al.*, 2006; MITANI *et al.*, 2009) através das aquaporinas. Além desses nutrientes, PIPs, NIPs e TIPs

mostraram ter um importante papel na absorção e mobilização de nitrogênio na planta (GERBEAU *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2003; LOQUÉ *et al.*, 2005; HWANG *et al.*, 2010).

A expressão de alguns genes de aquaporinas varia de acordo com a disponibilidade de nitrogênio no ambiente. Por exemplo, foi visto que *AtTIP2;1* de *Arabidopsis thaliana* é induzido na presença de amônio ou pela falta de nitrogênio no ambiente (LOQUÉ *et al.*, 2005). Em tomate, análises feitas em uma biblioteca de cDNA da raiz mostraram a indução de vários genes de aquaporinas por nitrato (WANG *et al.*, 2001), sendo o gene *ZmPIP1;5b* de milho também induzido por esta fonte nitrogenada (GASPAR *et al.*, 2003). Sabe-se que as aquaporinas não transportam nitrato por se tratar de um soluto carregado, entretanto, sua indução frente a esta fonte nitrogenada pode estar relacionada com o aumento da condutividade hidráulica em raízes (GORSKA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2016). Por outro lado, já foi comprovada a permeabilidade das MIPs à ureia e amônia (NH₃). Esta última por se tratar de um gás, inicialmente acreditava-se que não precisava de um transportador, uma vez que, podia ser difundida livremente através da membrana, entretanto, foi visto que células epiteliais de glândulas gástricas em humanos não apresentam permeabilidade aos gases como CO₂ e NH₃ (COOPER *et al.*, 2002). Dessa maneira, a presença de canais permeáveis a gases na membrana facilitaria a entrada de solutos voláteis. Em plantas, vários homólogos da subfamília TIP2 mostraram ser altamente permeáveis ao NH₃ (JAHN *et al.*, 2004; LOQUÉ *et al.*, 2005). Recentemente, KIRSCHT e colaboradores (2016), através de análises da estrutura cristalográfica da AtTIP2;1 permeável ao NH₃, observaram a existência de um poro (abaixo da alça C) adjacente ao resíduo de histidina no qual se liga o amônio (NH₄⁺), o qual cria uma massa de água ao redor do amônio que possibilitaria a sua desprotonação, e dessa maneira, permitiria a passagem da NH₃ através do poro.

Já a ureia, por se tratar de um composto neutro e de pequeno peso molecular, é facilmente transportada por aquaporinas. A primeira aquaporina analisada funcionalmente para o transporte de ureia foi uma TIP (NtTIPa) de tabaco (GERBEAU *et al.*, 1999). Desde então, algumas NIPs (em arabidopsis, milho, tabaco, abobrinha e pepino), PIPs (em milho e tabaco) e TIPs (em arabidopsis, tabaco e milho) têm se mostrado permeáveis à ureia (GERBEAU *et al.*, 1999; ECKERT *et al.*, 1999; GASPAR *et al.*, 2003; KLEB *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2003; SOTO *et al.*, 2008; GU *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2015a; ZHANG *et al.*, 2016). Estas últimas estariam envolvidas no equilíbrio das concentrações internas de ureia entre os diferentes compartimentos celulares, uma vez que as TIPs são direcionadas principalmente para o tonoplasto, organela na qual a ureia pode ser estocada (LIU *et al.*, 2003).

1.4. Aquaporinas de *Vriesea gigantea*

Como descrito anteriormente (capítulo I), *Vriesea gigantea* é uma bromélia de hábito epífita que mostrou uma alta capacidade para absorver ureia em altas concentrações. Este processo parece ser mediado por aquaporinas, uma vez que ao submeter as plantas ao HgCl_2 (inibidor de MIPs), a absorção de ureia foi reduzida em um 78% (INSELSBACHER *et al.*, 2007). Considerando que o ambiente epifítico está submetido à disponibilidade intermitente (ou sazonal) de água e nutrientes é de grande importância conhecer os elementos envolvidos na absorção de ureia quando esta fonte está disponível à planta.

Atualmente, sabe-se ainda muito pouco sobre o processo de absorção da ureia nessa espécie. Entretanto, em estudos feitos no nosso laboratório foram clonados de plantas de *V. gigantea* crescidas *in vitro* e tratadas com ureia, três genes de aquaporinas, *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* e *VgTIP2* (CAMBUÍ, 2009). *VgPIP1;5* e *VgTIP2*, apresentaram uma cópia única e maior identidade com MIPs de monocotiledôneas. Adicionalmente, quando tratadas com ureia houve uma maior expressão de *VgPIP1;5* e *VgTIP2* na região basal das folhas quando comparado com plantas cultivadas em meio sem nitrogênio ou em meio Knudson (nitrato+amônio). Mesmo tendo sido observada uma indução desses genes quando tratadas as plantas com ureia, desconhece-se a capacidade dessas aquaporinas em de fato transportar ureia, amônia ou água. Adicionalmente, o terceiro gene isolado de *V. gigantea*, *VgPIP1;2*, não foi caracterizado quanto à sua expressão nem funcionalidade de transporte.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

No presente capítulo visou-se caracterizar o processo de absorção de ureia, amônio e água por três aquaporinas encontradas em *Vriesea gigantea*: VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2, por meio da análise de expressão heteróloga dessas aquaporinas em ovócitos de *Xenopus laevis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, pretendeu-se determinar se as aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2 estão envolvidas com o transporte desses solutos, além da água.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Inferir a filogenia, estrutura e função de VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2 através de análises *in silico*.
- 2) Determinar a permeabilidade à água das aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2 por meio de sua expressão heteróloga em ovócitos de *X. laevis*.
- 3) Caracterizar o transporte de ureia através das aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2 por meio de sua expressão heteróloga em ovócitos de *X. laevis* e na linhagem mutante de levedura *S. cerevisiae* -YNVW1 ($\Delta dur3$ and $ura3$), deficiente na absorção de ureia.
- 4) Determinar a capacidade das aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2 em transportar NH_3/NH_4^+ através da sua expressão heteróloga na linhagem mutante de levedura *S. cerevisiae* -31019b ($\Delta mep 1-3$, $ura3$), deficiente na absorção de amônio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise filogenética, estrutural e predição da localização celular das sequências de aquaporinas de *Vriesea gigantea*

Para a análise filogenética, as sequências de genes que codificam aquaporinas de tonoplasto (TIP) e membrana plasmática (PIP) de diversas espécies de mono e eudicotiledôneas foram obtidas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foram selecionadas 55 sequências completas de cDNA (**Anexo 1**), sendo 21 TIPs, 29 PIP1 e 5 PIP2. As sequências deduzidas de aminoácidos foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalX 2.1 (<http://www.clustal.org/>). A árvore filogenética foi construída no programa MEGA 5.2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; <http://www.megasoftware.net/>) com 1000 réplicas de bootstrap e valor de corte de 70%.

A previsão da estrutura terciária das aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2 foi realizada através do servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>; YANG *et al.*, 2015b, ROY *et al.*, 2010, ZHANG, 2008) e as representações gráficas das proteínas foram geradas utilizando o programa PyMOL Molecular Graphics System (Schrödinger LLC). A previsão da localização subcelular foi feita no servidor LocTree3 (<https://roslab.org/services/loctree3>; GOLDBERG *et al.*, 2012, 2014) e a dos domínios transmembrana no servidor TMHMM versão 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>). Além disso, foi feita a análise *in silico* dos possíveis solutos transportados pelas aquaporinas baseada nas assinaturas das sequências dos filtros de seleção sugeridos por HOVE & BHAVE (2011).

3.2. Expressão heteróloga das aquaporinas de *V. gigantea* em ovócitos de *Xenopus laevis*

A expressão heteróloga dos genes de aquaporinas em ovócitos de *X. laevis* foi realizada sob supervisão do Prof. Dr. François Chaumont, do Institut des Sciences de la Vie (ISV) da Université Catholique de Louvain (UCL) em Louvain-la-Neuve, Bélgica. A metodologia usada para a expressão heteróloga foi baseada na descrita por BIENERT *et al.* (2011).

a) Clonagem dos cDNAs nos vetores para expressão heteróloga em *Xenopus*, levedura ou planta

Para a expressão heteróloga em ovócitos de *X. laevis*, os cDNAs *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* e *VgTIP2* foram amplificados usando primers específicos (**Tabela I.1**). Os produtos da PCR foram direcionalmente sub-clonados através da técnica de excisão uracila-específica (USER) em vetores USER-compatíveis de expressão em *X. laevis*, pNB1u (contendo ou não a fusão da proteína fluorescente amarela (YFP) na posição N-terminal da proteína de interesse) (NOUR-ELDIN *et al.*, 2006). O vetor pNB1u possui um promotor RNA polimerase (T7) e um sítio de clonagem entre *XmaI* e *EcoRI*, localizado entre as sequências 5' e 3' não traduzidas do gene de β -globina de *X. laevis*, o qual confere uma elevada eficiência de tradução dos cRNAs heterólogos nos ovócitos.

Para o ensaio de complementação em *Saccharomyces cerevisiae*, os cDNAs foram clonados em vetores de expressão para levedura pYeDP60u (HAMANN & MOLLER, 2007). Para a localização subcelular da *VgTIP2* em tabaco, o produto de PCR da *VgTIP2* foi clonada nos vetores pCAMBIA2300 35S N-term-YFP-u e pCAMBIA2300 35S C-term-YFP-u (NOUR-ELDIN *et al.*, 2006).

Tabela I.1: Primers usados para a amplificação dos cDNAs *V. gigantea* em vetores USER-compatíveis.

Primer		Sequência
<i>VgPIP1;2-USER</i>	Fw	GGCTTAAUATGGAAGGCAAGGAGGAG
<i>VgPIP1;2-USER</i>	Rv	GGTTTAAUTTAAGCCCTGCTTTTGAA
<i>VgPIP1;5-USER</i>	Fw	GGCTTAAUATGGAGGGGAAGGAGGAG
<i>VgPIP1;5-USER</i>	Rv	GGTTTAAUTCAAGCCCTGCTCTCAAA
<i>VgTIP2-USER</i>	Fw	GGCTTAAUATGGCGGGGATCGCATTC
<i>VgTIP2-USER</i>	Rv	GGTTTAAUTCAGTGATTAGGATAATC
<i>VgTIP2-Cterm-USER*</i>	Rv	GGTTTAAUCCGTGATTAGGATAA

*Foi usado para amplificar o cDNA no vetor pCAMBIA2300 35S C-term-YFP-u.

b) Síntese *in vitro* dos cRNAs para a sua injeção em ovócitos

Os cDNAs sub-clonados nos vetores-USER, pNB1u, foram linearizados utilizando a enzima de restrição *XhoI* (10 U/ μ L -Roche Life Science). A reação ocorreu durante 3 horas a 37°C. Após purificação do cDNA linearizado (usando o kit NucleoSpin Purification da Macherey-Nagel), os cRNAs foram sintetizados usando a polimerase T7 (20 U/ μ L- Roche Life Science) e adicionado o Cap através do uso do análogo Ribo m⁷G cap (New England Biolabs) para posterior injeção nos ovócitos, como descrito por PRESTON *et al.* (1992) e FETTER *et al.* (2004). Os cRNAs foram quantificados com o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (NanoDrop Technologies) e a sua integridade foi verificada em gel de agarose.

c) Seleção de ovócitos e injeção

Ovócitos de *X. laevis* (Estágio Dumont V ou VI) foram isolados e defoliculados usando 4 mg/mL de colagenase A (0.271 U/mg liofilizado) e mantidos a temperatura ambiente em solução Barth 200 mosm L⁻¹ (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2,4 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes, 0,82 mM MgSO₄; pH 7,4) por 60-90 minutos. Após esse período, os ovócitos foram lavados 5 vezes com solução Barth 200 mosm L⁻¹ e finalmente, 5 vezes com solução Barth 200 mosm L⁻¹ contendo cálcio (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,41 mM CaCl₂, 2,4 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes, 0,33 mM Ca(NO₃)₂, 0,82 mM MgSO₄; pH 7,4). Posteriormente, 50 nL de cRNA foram injetados nos ovócitos de *X. laevis* (**Tabela I.2**). Depois da injeção, os ovócitos foram mantidos na solução Barth 200 mosm L⁻¹ contendo cálcio e suplementada com sulfato de gentamicina (50 µg/mL) a 18°C durante 3 dias para, posteriormente, realizar as análises de permeabilidade da membrana à água e de transporte de ureia.

Tabela I.2: Quantidade de cRNA (em ng) injetado por ovócito de cada transcrito de interesse. O dobro de ng dos transcritos carregando mYFP foram injetados nos ovócitos, visando ter a mesma quantidade de cRNA codificado para a aquaporina de interesse, já que, YFP possui aproximadamente o mesmo tamanho de uma aquaporina.

cRNA	Volume injetado por ovócito [nL]	Quantidade de cRNA por ovócito [ng]	Análise
<i>VgPIP1;2</i>	50	12.5	Permeabilidade à água
<i>VgPIP1;5</i>	50	12.5	Permeabilidade à água
<i>VgTIP2</i>	50	4	Permeabilidade à água
<i>VgTIP2</i>	50	5	Transporte de ureia
<i>YFP-VgPIP1;2</i>	50	25	Imagem confocal
<i>YFP-VgPIP1;5</i>	50	25	Imagem confocal
<i>YFP-VgTIP2</i>	50	8	Imagem confocal
<i>ZmPIP2;5</i>	50	4	Permeabilidade à água
<i>ZmPIP2;5</i>	50	6	Transporte de ureia
<i>rAQP9</i>	50	12.5	Transporte de ureia

d) Análise de permeabilidade da membrana à água em ovócitos de *Xenopus* expressando as aquaporinas *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* e *VgTIP2*

Após o período de injeção, os ovócitos foram transferidos da solução de Barth (200 mosmol. L⁻¹) para outra 2 vezes mais diluída com água destilada-deionizada (100 mosmol. L⁻¹). As mudanças no volume dos ovócitos foram monitoradas usando um sistema de microscópio de

vídeo, com o qual foi possível medir o coeficiente de permeabilidade osmótica (Pf), calculado a partir da fórmula:

$$Pf = [V_0 \times d(V/V_0)/dt] / [S \times V_w \times (Osm_i - Osm_0)]$$

Onde V é o volume do ovócito no tempo t, V₀ é o volume inicial, S é a área inicial do ovócito (cm²), o V_w é o volume molar da água (cm³. mol⁻¹) e o (osm_i - osm₀) é a diferença de osmolaridade entre as duas soluções Barth (mosmol. L⁻¹).

e) Análise de permeabilidade à ureia em ovócitos de *Xenopus* expressando as aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2

A permeabilidade à ureia foi medida de acordo com BIENERT *et al.* (2011) e GASPAR *et al.* (2003). Após 3 dias da injeção dos ovócitos com os diferentes cRNAs, esses foram incubados a temperatura ambiente em 1 mL da solução iso-osmótica de Barth contendo 1 mM de ureia não marcada suplementada com [¹⁴C]-ureia (57 µCi mol⁻¹; Amersham Pharmacia Biotech). Após 0, 5 e 10 min de incubação, os ovócitos foram lavados rapidamente 4 vezes com solução Barth gelada contendo 100 mM de ureia não marcada. Individualmente, os ovócitos foram lisados por 2 a 3 horas em um 1 mL de 5% (p/v) SDS para contagem da radioatividade em cintilômetro. Como controle positivo foi usada a aquaporina AQP9 de coelho, uma aquaporina transportadora de ureia (TSUKAGUCHI *et al.*, 1998). A permeabilidade ao soluto (P_{sol}) foi calculada através da equação:

$$P_{sol}(\text{pmol/ovócito/10 min}) = (CPM_{amostra} - CPM_{branco}) \times [\text{solute}] / \text{STD}$$

Onde CPM_{amostra} e CPM_{branco} são as contagens por minuto (CPM) por ovócito (incubado durante 10 minutos) com ou sem o soluto, respectivamente. [solute] é a concentração da ureia (pmol/L) na qual os ovócitos foram incubados e o STD é a diferença entre o CPM do soluto e o CPM do branco.

Além disso, a permeabilidade à ureia foi corroborada através de um segundo ensaio de expressão heteróloga usando a linhagem mutante de *S. cerevisiae*, YNVW1 (LIU *et al.*, 2003).

f) Microscopia confocal dos ovócitos de *Xenopus* expressando as aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2

Visando analisar a localização das aquaporinas nos ovócitos de *Xenopus*, foram injetados cRNAs codificantes para VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2 fusionados no seu N-terminal com a proteína fluorescente, YFP como descrito por BESSERER *et al.* (2012). Três dias após a injeção, estes foram fixados em uma solução 4% (p/v) de paraformaldeído (PFA) em tampão PBS 1x, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, os ovócitos foram lavados 5 vezes com tampão PBS 1x (previamente resfriado) e cortados pela metade. A fluorescência foi observada através de microscopia confocal (Zeiss LSM710-Jena, Germany), usando um objetivo Plan-Neofluar X10/0.30. mYFP foi excitada a 514 nm e a fluorescência emitida foi detectada entre 513 e 688 nm. O software Zen 2009 (Carl Zeiss Micro Imaging, Jena, Germany) foi usado para remover o fundo de fluorescência emitida pelo espectro da mYFP. As imagens foram analisadas usando o software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>).

3.3. Expressão heteróloga dos genes de aquaporinas de *V. gigantea* na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

a) Transformação das linhagens WT, YNVW1 e 31019b de levedura

A metodologia usada é baseada na descrita previamente por SCHIEST & GIETZ. (1989) com algumas modificações. As linhagens WT, YNVW1 (*dur3, ura3*) e 31019b (Δ *mep 1-3, ura3*) foram crescidas em meio sólido YPD durante 3 dias a 28°C, após esse período, foi selecionada uma colônia e crescida em meio YPD líquido *overnight* sob agitação a 200 rpm a 30°C (pre-inóculo). Posteriormente, 1 mL do pre-inóculo foi crescido durante 4 horas nas mesmas condições descritas anteriormente, e transferido a tubos tipo falcon de 15 mL. Os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos a 23°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 5 mL de tampão TEL estéril (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 M acetato de lítio; pH 7.5) foram adicionados. Os tubos contendo o TEL foram centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos a 23°C e o sobrenadante foi descartado.

A seguir, o pellet foi ressuspensionado com TEL e alíquotas de 100 µL foram utilizadas para a transformação. Para tanto, 5 µL de DNA *carrier* de salmão previamente desnaturado (a 90°C por 5 min e colocado posteriormente no gelo) e 3 µL do plásmideo contendo o cDNA de interesse foram mantidos por 20 minutos a temperatura ambiente. Depois, 700 µL de PEG 40% (polietilenoglicol 3350 dissolvido em TEL e autoclavado) foram adicionados aos tubos, os quais permaneceram durante 35 minutos a temperatura ambiente antes de serem transferidos a um banho-maria a 42°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM Na₂EDTA; pH 7,5) a cada tubo e centrifugados a 13500 rpm por 30 segundos. Depois de descartado o sobrenadante e ressuspensionado o pellet com 1 mL de TE, a mistura foi espalhada

em uma placa contendo meio mínimo SD (2% de galactose, 0,67% YNB-Yeast Nitrogen Base Difco, sem aminoácidos e 2% de ágar), para a seleção das transformantes, e mantidas a 30°C por aproximadamente 3 dias.

b) Análise de permeabilidade à ureia na linhagem de levedura YNVW1 (deficiente na absorção de ureia) ou $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ na linhagem 31019b (deficiente na absorção de amônio) expressando as aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2

A análise do transporte de ureia na linhagem YNVW1 foi feita como descrito por LIU *et al.* (2003) e BIENERT *et al.* (2011). O crescimento dos transformantes foi registrado após 8 dias no meio mínimo sintético contendo 2% galactose, 0,17% YNB-Difco sem aminoácidos nem sulfato de amônio, 2% ágar e suplementado com 2, 4, 5 ou 20 mM de ureia como fonte única de nitrogênio e pH 5,5.

O ensaio de permeabilidade ao amônio foi realizado de acordo com JAHN *et al.* (2004) utilizando a linhagem mutante 31019b (MARINI *et al.*, 1997). Os transformantes foram crescidos em meio sintético contendo 2% galactose, 0,17% YNB fontes de sem aminoácidos nem amônio (Difco), 2% ágar e suplementado com diferentes concentrações de amônio (0,5, 1, 2, 5 e 10 mM de sulfato de amônio) como fonte única de nitrogênio a pH 5,5 ou 7,5. O crescimento das transformantes foi registrado após 10 dias.

3.4. Localização da VgTIP2 em células de tabaco

A expressão transiente de VgTIP2 em células de tabaco foi realizada de acordo com BATOKO *et al.* (2000) e BIENERT *et al.* (2011) com algumas modificações. VgTIP2 foi clonada nos vetores de expressão pCAMBIA2300 35S N-term-YFP-u e pCAMBIA2300 35S C-term-YFP-u para produzir fusões traducionais da extremidade N-terminal ou C-terminal da proteína com a YFP, respectivamente. Os vetores de expressão foram introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens* (linhagem AGL1) por eletroporação. Duas colônias dos transformantes foram inoculadas em 5 mL de meio LB (10% triptona, 5% extrato de levedura, 5% NaCl e 15% agar; pH 7,5) suplementado com 100 µg/mL carbenicilina e 50 µg/mL kanamicina. A cultura bacteriana foi incubada a 28°C com agitação até atingir uma OD₆₀₀ entre 0,5 e 0,7. Posteriormente, 4 mL da cultura bacteriana foram centrifugados a 5000 g por 7 minutos. O pellet foi lavado duas vezes com 2 mL do tampão de infiltração (50 mM MES, 2 mM Na₃PO₄, 0,5 % glicose; pH 5,6), ressuspendido em 2 mL do mesmo tampão suplementado com 100 mM de acetosiringona (Aldrich) e incubado durante 2 horas a temperatura ambiente.

A parte abaxial das folhas de *Nicotiana benthamiana* (3 semanas de idade) foi infiltrada com o inóculo utilizando uma seringa sem agulha. Visando co-expressar *HDEL-CFP* (usado como sonda do retículo endoplasmático) com *VgTIP2-YFP* ou *YFP-VgTIP2*, a respectiva linhagem de *Agrobacterium* foi misturada antes de infectar a folha. Três dias depois da infiltração, segmentos das folhas infiltradas foram cortados e incubados durante 20 minutos em 40 μ M de FM 4-64 para conseguir a marcação da membrana plasmática.

A epiderme abaxial das folhas foi observada no microscópio confocal LSM 710 (Zeiss). As fusões YFP e CFP foram excitadas a 514 e 445 nm e a fluorescência emitida detectada na faixa de 520 a 620 nm e 450 a 510 nm, respectivamente. O FM 4-64 foi excitado a 514 nm e o sinal emitido foi detectado de 600 a 760 nm. As imagens foram analisadas usando o software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>).

VgPIP1;2 apresentou maior similaridade de sequência com as PIP1;1 de *Morus notabilis*, *Triticum turgidum*, *Oryza sativa* e *Zea mays*, assim como, com PIP1;2 de *Zea mays*. Já VgPIP1;5 mostrou maior similaridade de sequências com a PIP1;1 da bromélia *Ananas comosus* e PIP1 de um cultivar híbrido de *Gladiolus* e ZmPIP1;5 de milho, sendo que, para esta última já foi reportada sua capacidade para transportar ureia. VgTIP2 apresentou maior similaridade com a TIP2 de *Lilium longiflorum*, e a TIP2;1 e TIP2;3 de *Zea mays*.

Além da análise filogenética foi feita uma predição estrutural das aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2, com base em sua sequência de aminoácidos, para poder determinar *in silico* quais substratos (amônia, boro, CO₂, H₂O₂, silício ou ureia) estas poderiam transportar, baseados nos resíduos dos filtros NPA, ar/R e os motivos P1-P5 e AEFXXT propostos por HOVE & BHAVE (2011). Para tanto, primeiro foram identificados os domínios transmembrana (através do servidor TMHMM) e as alças (LA-LE) das aquaporinas de *V. gigantea* (**Figura I.3A**). Posteriormente, as sequências foram alinhadas com a AQP1 bovina (SUI *et al.*, 2001) e a GlpF (gliceroporina) (FU *et al.*, 2000), duas aquaporinas com estrutura terciária determinada por cristalografia, para poder identificar as posições e resíduos dos diferentes filtros nas aquaporinas de *V. gigantea* (**Figura I.3**). Os dados *in silico* sugeriram que VgPIP1;2 não transportaria nenhum dos substratos sugeridos por HOVE & BHAVE (2011), se considerados todos os resíduos recomendados para cada filtro de seleção, entretanto, VgPIP1;2 teria a capacidade de transportar CO₂, H₂O₂ e ureia se for desconsiderado o resíduo E (glutamato) do motivo P1 na alça C. Por sua vez, VgPIP1;5 poderia transportar boro, CO₂, H₂O₂, e ureia, enquanto que a VgTIP2 transportaria H₂O₂, amônia e ureia.

Adicionalmente, foi analisada a estrutura terciária das três aquaporinas de *V. gigantea* através do servidor I-TASSER (**Figura I.4**). O servidor cria um modelo 3D baseado nos bancos de dados de proteínas cuja estrutura terciária já foi resolvida por cristalografia. Junto com os modelos gerados é calculado o *C-score*, o qual estima a precisão global do modelo. Assim, os valores do *C-score* podem variar entre -5 e 2, sendo que valores maiores de -1,5 indicam uma correta topologia global do modelo gerado. Os *C-scores* de VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2 foram -0,60, -0,43 e 1,49, respectivamente, indicando bons modelos terciários. Adicionalmente, foi observado que VgTIP2 mostrou a maior variabilidade dos resíduos que compõem os filtros seletivos em relação às PIP1s de *V. gigantea* (**Figura I.4C**), sugerindo uma diferente seletividade entre PIP1s e a TIP2 de *V. gigantea*.

B

	NPA		Ar/R				P1-P5					AEFXXT
	LB	LE	H2	H5	LE1	LE2	P1	P2	P3	P4	P5	
VgPIP1;2	SGGHINPAVT	GTGINPARSLG	F	H	T	R	E	S	A	F	W	+
VgPIP1;5	SGGHINPAVT	GTGINPARSLG	F	H	T	R	Q	S	A	F	W	+
VgTIP2	SGGHVNPAVT	GGSMNPARSFG	H	I	G	R	T	S	A	Y	W	+

Figura I.3: Sequências protéicas deduzidas das aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5, VgTIP2 (A) e resíduos de aminoácidos contidos nos filtros de seletividade propostos por HOVE & BHAVE (2011) (B). Nas sequências deduzidas são mostrados os resíduos que formam o filtro NPA (amarelo), o filtro ar/R (vermelho), os motivos P1-P5 (verde), o motivo AEFXXT e a Leu197 (roxo, respectivamente) e o Thr71 em PIP1s (azul marinho). Adicionalmente são indicados os domínios transmembrana (azul), os loops LA-LE (cinza) e os *box* pretos mostram os resíduos altamente conservados entre as aquaporinas. H2 e H5 são as hélices- α 2 e 5 localizadas nos domínios transmembrana TM2 e TM5, respectivamente.

Figura I.4: Análise *in silico* da estrutura terciária das aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2. (A) Visão lateral das aquaporinas, mostrando o C-terminal para o lado intracelular. (B e C) Visão do lado extracelular do poro das aquaporinas. Filtro 1 (roxo e vermelho-NPA), filtro ar/R (azul), motivos P1-P5 (amarelo) e resíduo Leu197 (ciano). Em (C) a cor vermelha representa os resíduos dos filtros que diferem de uma aquaporina para a outra. As imagens foram geradas com o programa PyMOL Molecular Graphics System.

4.2. Análises de permeabilidade da membrana à água, ureia e $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$

Para determinar se as aquaporinas de *V. gigantea* seriam permeáveis à água, o coeficiente de permeabilidade osmótica (Pf) foi medido em ovócitos injetados com os cRNAs VgPIP1;2, VgPIP1;5 ou VgTIP2. A injeção dos cRNAs de VgPIP1;2 e VgPIP1;5 isoladamente, não mostrou efeito sobre o Pf quando comparado com ovócitos injetados com água (controle). No

entanto, VgTIP2 mostrou uma elevada capacidade de transporte de água, sendo o Pf cinco vezes maior do que o Pf dos ovócitos controle (**Figura I.5**).

Estudos anteriores mostraram que a co-expressão com isoformas da subclasse PIP2 é necessária para direcionar as isoformas de PIP1 à membrana plasmática do ovócito e, dessa maneira, poder testar a sua atividade como transportador de água (FETTER *et al.*, 2004). Assim sendo, a co-expressão foi testada para VgPIP1;2 e VgPIP1;5. Uma vez que as aquaporinas do tipo PIP2 não têm sido clonadas em *V. gigantea*, as VgPIP1s foram co-expressas com a ZmPIP2;5 de milho. Além disso, a localização subcelular de VgPIP1;2 e VgPIP1;5 expressas individualmente ou co-expressas com ZmPIP2;5 foi verificada por fusão com o YFP (**Figura I.6**).

Figura I.5: Coeficiente de permeabilidade osmótica (Pf) à água de ovócitos de *X. laevis* expressando as aquaporinas de *V. gigantea*. Para o ensaio de transporte de água, os ovócitos foram injetados com água, 12,5 ng de cRNA de VgPIP1;2 ou VgPIP1;5, ou 4 ng de cRNA de VgTIP2 ou ZmPIP2;5. As análises foram feitas três dias após a injeção dos ovócitos. Os resultados são expressos como a média $\pm$ DP de 10 a 15 células de um de três ensaios independentes. Os asteriscos indicam as diferenças entre os ovócitos injetados com água (controle negativo) e os ovócitos injetados com cRNA de aquaporinas (t-Student; $p < 0,05$).

Como mostra a **figura I.6B-C**, YFP-VgPIP1;2 e YFP-VgPIP1;5 expressas isoladamente não foram direcionadas à membrana plasmática. Entretanto, quando estas aquaporinas foram co-expressas com a ZmPIP2;5, foi observado um efeito sinérgico no Pf (**Figura I.5**) assim como foi possível detectá-las na membrana plasmática (**Figura I.6E-F**), indicando que as PIP2s (neste caso ZmPIP2;5) são necessárias para a correta localização das PIP1s na membrana plasmática.

Figura I.6: Microscopia confocal de ovócitos de *Xenopus* mostrando a localização de YFP-VgPIP1;2, YFP-VgPIP1;5 ou YFP-VgTIP2 na membrana. Os ovócitos foram injetados com água (A), 25 ng de mYFP-VgPIP1;2 (B) ou mYFP-VgPIP1;5 (C), com ou sem 4 ng de cRNA de *ZmPIP2;5* (E, F, respectivamente), ou 8 ng de cRNA de mYFP-VgTIP2 (D). As análises foram feitas três dias após a injeção dos ovócitos. Barras brancas= 100 μ m.

Uma vez comprovada a capacidade das aquaporinas em transportar água, foi analisada a sua capacidade em transportar ureia através de ensaios com radioisótopos em ovócitos de *Xenopus* e complementação em levedura. No ensaio com o radioisótopos, a absorção de ureia foi analisada incubando os ovócitos durante 10 minutos em uma solução isosmótica contendo ureia marcada com [14 C]. A absorção de ureia foi aproximadamente 3 vezes mais elevada em ovócitos expressando a VgTIP2 do que nos ovócitos controle (injetados com água). Por outro lado, VgPIP1;2 e VgPIP1;5 não foram capazes de facilitar o transporte de ureia quando expressas individualmente ou co-expressas com *ZmPIP2;5*. Portanto, VgTIP2 foi a única aquaporina capaz de facilitar a difusão da ureia através da membrana do ovócito (**Figura I.7**).

Estes resultados foram confirmados por um ensaio de complementação funcional na linhagem de *S. cerevisiae* defeituosa na absorção de ureia, YNVW1 ($\Delta dur3$ e *ura3*). Este mutante de levedura carrega uma deleção no gene transportador de ureia *DUR3*, tornando-o incapaz de crescer em meio contendo menos de 5 mM de ureia como fonte única de nitrogênio (LIU *et al.*, 2003).

Figura I.7: Permeabilidade à ureia em ovócitos de *Xenopus* expressando as aquaporinas de *V. gigantea*. Os ovócitos foram injetados com água (controle negativo), 12,5 ng cRNA de *rAQP9* (aquaporina de coelho, controle positivo), *VgPIP1;2* ou *VgPIP1;5*, ou 5 ng de cRNA de *VgTIP2* ou 6 ng de *ZmPIP2;5*. As análises foram realizadas 3 dias depois da injeção dos ovócitos. Os ovócitos foram incubados em uma solução isosmótica contendo 1 $\mu\text{Ci. mL}^{-1}$ [^{14}C]-ureia. Os resultados são expressos como a média $\pm$ DP de 10 células de um pool de dois ensaios independentes. Os asteriscos indicam as diferenças entre os ovócitos injetados com água (controle negativo) e os ovócitos injetados com cRNA de aquaporinas (t-Student; $p < 0,05$).

Todos os transformantes de levedura foram capazes de crescer em 20 mM de ureia. Tanto *rAQP9* (controle positivo) como *VgTIP2* foram capazes de complementar o crescimento da linhagem de levedura YNVW1 em 2, 4 e 5 mM de ureia como fonte única de N (**Figura I.8A**), confirmando a capacidade de *rAQP9* e *VgTIP2* de facilitar a difusão de ureia. A linhagem selvagem (WT) foi também transformada com o vetor vazio (VV) ou o vetor contendo *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* ou *VgTIP2* para mostrar que a própria transformação não afetou a viabilidade da levedura (**Figura I.8B**).

Figura 1.8: Análise do transporte de ureia em *S. cerevisiae* transformada com as aquaporinas de *V. gigantea*. As linhagens YNVW1 ($\Delta dur3$ e *ura3*), deficiente na absorção de ureia (A) ou selvagem (B) foram transformadas com o vetor vazio (VV) pYeDP60u ou pYeDP60u contendo o cDNA das AQPs de *V. gigantea*. Os transformantes foram plaqueados a OD₆₀₀ de 10⁻² ou 10⁻⁵ em meios contendo 2, 4, 5 ou 20 mM de ureia como fonte única de nitrogênio a pH 5,5. O crescimento foi registrado após 8 dias.

Para determinar se as aquaporinas de *V. gigantea* facilitariam a difusão de NH₄⁺/NH₃ através das membranas, realizou-se um ensaio de complementação de levedura. A linhagem mutante de levedura *S. cerevisiae* 31019b ($\Delta mep 1-3$, *ura3*) carrega uma deleção nos genes transportadores de amônio *Mep1*, *Mep2* e *Mep3*, tornando-as incapazes de crescer em meios contendo menos de 5 mM de amônio (MARINI *et al.*, 1997). Assim, a linhagem 31019b foi transformada com os cDNAs de *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* ou *VgTIP2* ou com o vetor vazio.

Os transformantes expressando *VgPIP1;2* cresceram melhor do que a levedura transformada com o vetor vazio (controle) em concentrações de 10 a 1 mM de amônio (**Figura I.9A**). No entanto, isto foi observado apenas em pH baixo (pH 5,5). Em pH 7,5 todos os transformantes cresceram bem (mesmo o transformante com o vetor vazio), sugerindo que *VgPIP1;2* pode facilitar o transporte de amônio, em vez de amônia. A linhagem selvagem (WT) foi também transformada com diferentes cDNAs de *AQP*, com o objetivo de mostrar que a própria transformação não afetou a viabilidade da levedura (**Figura I.9B**).

Figura I.9: Análise do transporte de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ em *S. cerevisiae* transformada com as aquaporinas de *V. gigantea*. As linhagens 31019b ($\Delta mep1-3$ e *ura3*), deficiente na absorção de amônio (A) ou selvagem (B) foram transformadas com o vetor vazio (VV) pYeDP60u ou pYeDP60u contendo o cDNA das *AQPs* de *V. gigantea*. Os transformantes foram plaqueados a OD_{600} de 10^{-2} ou 10^{-5} em meios contendo 0,5, 1, 2, 5 ou 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte única de nitrogênio em pH 5,5 ou pH 7,5. O crescimento foi registrado após 10 dias.

4.3. Localização subcelular da VgTIP2 em células de tabaco

As aquaporinas da subfamília TIP geralmente estão localizadas no tonoplasto. As análises *in silico* da localização subcelular das aquaporinas de *V. gigantea* mostraram que VgTIP2 estaria na membrana vacuolar, enquanto que as PIP1s estariam localizadas na membrana plasmática (**Tabela I.3**). No entanto, considerando que VgTIP2 foi a única aquaporina capaz de transportar ureia, questionou-se se VgTIP2 poderia estar localizada na membrana plasmática e, nesse sentido, mediar a captação de ureia do meio externo para dentro da célula. Deste modo, foi realizada a expressão transiente de YFP-VgTIP2 (YFP no N-terminal da aquaporina alvo) e

VgTIP2-YFP (YFP no C-terminal da aquaporina alvo) em células epidérmicas de tabaco. Ambas as proteínas de fusão mostraram um sinal baixo na membrana plasmática como observado na co-localização com a fluorescência do marcador de membrana plasmática FM 4-64 (**Figura I.10**). Ao contrário, YFP-VgTIP2 e VgTIP2-YFP foram detectados principalmente no retículo endoplasmático (ER) como evidenciado pela co-localização com o marcador HDEL-ER.

Tabela I.3: Análise *in silico* da localização subcelular das aquaporinas VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2.

	Localização subcelular	Confiança da previsão	Precisão esperada
VgPIP1;2	Membrana plasmática	87	97%
VgPIP1;5	Membrana plasmática	90	97%
VgTIP2	Membrana vacuolar	72	95%

Figura 1.10: Localização de VgTIP2 em células de tabaco. Expressão transiente de VgTIP2-YFP (A) ou YFP-VgTIP2 (B) em células epidérmicas de tabaco. Os painéis superiores correspondem à fluorescência de YFP, FM 4-64 (marcador de membrana plasmática) e HDEL-CFP (indicando a localização do retículo endoplasmático), respectivamente. Os painéis inferiores correspondem ao *merge* das imagens. Barras brancas= 10 μ m.

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise filogenética e estrutural das sequências protéicas deduzidas das aquaporinas de *V. gigantea*

As aquaporinas pertencem à família das MIPs, presente em microorganismos, plantas e animais, as quais permitem a passagem de água e pequenos solutos neutros através da membrana. Baseado na similaridade das sequências, em monocotiledôneas e eudicotiledôneas, as aquaporinas estão divididas em cinco subfamílias (PIPs, TIPs, NIPs, SIPs e XIPs). Em *V. gigantea* foram clonados três cDNAs de aquaporinas, os quais foram inicialmente nomeados de *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* e *VgTIP2* pela sua similaridade com sequências com outras PIP1;2, PIP1;5 e TIP2 de plantas (CAMBUÍ, 2009). Desde então, tem sido identificadas novas aquaporinas entre mais de 15 espécies vegetais (LUANG & HRMOVA, 2017). No presente trabalho foram selecionadas cerca de 55 sequências de PIPs (subclasses PIP1 e PIP2) e TIPs para a construção de uma árvore filogenética (**Figura I.2**). As três sequências de *V. gigantea* apresentaram maior similaridade com sequências de monocotiledôneas, sendo que, *VgPIP1;2* e *VgPIP1;5* foram homólogas a MIPs do tipo PIP1;1. Já *VgTIP2* apresentou maior similaridade com TIPs do subgrupo 2 (em plantas vasculares existem 5 subgrupos de TIPs possíveis- ANDERBERG *et al.*, 2012).

VgPIP1;2, mostrou alta homologia com PIP1s de *Morus notabilis* e *Triticum turgidum*, para as quais ainda não foi identificada a capacidade de transporte de água ou de outras moléculas. Esta mesma aquaporina também mostrou alta similaridade com PIP1;1 de arroz e milho. *OsPIP1* de *Oryza sativa* quando expresso em ovócitos de *Xenopus laevis* apresentou uma permeabilidade à água de duas a três vezes maior do que o controle (ovócitos não injetados com o cRNA da aquaporina *OsPIP1*)(LI *et al.*, 2000). Posteriormente, SAKURAI e colaboradores (2005) mostraram que *OsPIP1;1* não apresentava atividade de aquaporina quando expressa na linhagem mutante de levedura BJ5458 (a qual não possui aquaporinas funcionais). Já *ZmPIP1;1* e *ZmPIP1;2* de milho mostraram inicialmente serem não permeáveis à água (CHAUMONT *et al.*, 2000), entretanto, estudos posteriores indicaram que estas devem ser co-expressas com PIP2s para serem direcionadas à membrana e ter função aquaporina. Dessa forma, foi comprovado que a *ZmPIP1;2* possui a capacidade de transportar água quando co-expressa com *ZmPIP2;5* (FETTER *et al.*, 2004).

Por outro lado, VgPIP1;5 mostrou uma alta homologia com as PIP1;1 de *Ananas comosus* (96%) e *Gladiolus* sp (93%), sendo que ainda não foi estudada a capacidade destas em transportar água ou solutos. Contudo, VgPIP1;5 também mostrou alta identidade com ZmPIP1;5 (88%), para a qual já foi confirmada sua capacidade de transportar água e ureia (GASPAR *et al.*, 2003). Curiosamente, VgPIP1;5 apresentou uma maior expressão nas bases foliares de plantas *in vitro* de *V. gigantea* quando tratadas com ureia após um período de starving de nitrogênio (CAMBUÍ, 2009). Estes resultados poderiam indicar que VgPIP1;5 teria a capacidade em transportar ureia. Entretanto, os ensaios de expressão heteróloga em ovócitos e na linhagem mutante de levedura indicaram o contrário, conforme será discutido mais adiante (**Figuras I.7 e I.8**).

Por sua vez, a VgTIP2 apresentou alta identidade com ZmTIP2;1(72%) e ZmTIP2;3 (72%) de *Zea mays* sendo essa última, capaz de transportar água e ser induzida durante o estresse osmótico (LOPEZ *et al.*, 2003). De maneira interessante, ambas as TIPs de milho são expressas principalmente na raiz (CHAUMONT *et al.*, 2000; LOPEZ *et al.*, 2003), sendo que estudos prévios mostraram que o gene VgTIP2 foi expresso em folhas de plantas *in vitro*, sendo mais fortemente expresso na base foliar de plantas mantidas em ureia, quando comparado com plantas mantidas sem nitrogênio ou em meio nitrato+amônio (CAMBUÍ, 2009). Contudo, não se conhece o perfil de expressão de VgTIP2 em raízes de *V. gigantea*, sendo essa uma etapa que está sendo realizada atualmente no nosso laboratório.

Tanto as PIPs quanto a TIP de *V. gigantea* apresentaram maior similaridade com MIPs de monocotiledôneas para as quais, na maioria dos casos, se desconhece sua capacidade de transporte de água e sua afinidade por solutos. Por isso, foi feita uma análise *in silico* das possíveis permeabilidades que teriam as MIPs de *V. gigantea* baseado nas sequências primárias dos filtros do poro, conforme proposto por HOVE & BHAVE (2011) (**Figura I.3**). Focando nas fontes nitrogenadas (amônia e ureia), os dados *in silico* sugeriram que VgPIP1;2 não transporta nenhum dos substratos, enquanto a ureia seria transportada por VgPIP1;5 e VgTIP2. Adicionalmente, esta última também seria permeável à amônia.

Os altos valores dos *C-score* das estruturas terciárias das aquaporinas de *V. gigantea* implicam uma correta topologia da estrutura. É discutido na literatura que para ter uma modelagem precisa é indicado ter pelo menos 30% de identidade entre a sequência alvo e o molde (ESWAR *et al.* 2007). Recentemente, foi possível conhecer a estrutura terciária de AtTIP2;1 de *Arabidopsis thaliana* (KIRSCHT *et al.*, 2016), sendo esta e SoPIP1;2 de espinafre, as duas únicas aquaporinas de plantas com estrutura terciária conhecida por cristalografia

(TÖRNROTH-HORSEFIELD *et al.*, 2006). A alta similaridade de estrutura obtida nos modelos 3D da VgPIP1;2, VgPIP1;5 e VgTIP2 pode ser devida, em parte, à elevada identidade que estas possuem com as sequências SoPIP1;2 e AtTIP2;1 e à alta identidade entre os membros dessa família multigênica (**Anexo I.2**). Apesar da notória conservação na conformação estrutural das MIPs, a região do filtro seletivo é bastante variável quando comparada a VgTIP2 com as PIP1s de *V. gigantea* (**Figura I.4C**).

Ao analisar os resíduos dos filtros de seleção das MIPs de *V. gigantea*, foi possível observar que a VgPIP1;2 na posição de Froger P1 possui um resíduo carregado de glutamato (E), sendo este mais hidrofílico do que o resíduo Q da VgPIP1;5 ou T da VgTIP2, ambos polares não carregados (**Figura I.3B**). Adicionalmente, foi visto que a polaridade dos resíduos (mais hidrofóbicos) da TIP2 (H-I-G-R) muda com relação à VgPIP1;2 ou à VgPIP1;5 (F-H-T-R), especialmente no motivo ar/R. Além disso, na alça E junto ao motivo NPA as VgPIP1s possuem resíduos mais hidrofóbicos (G-T-G-I) do que VgTIP2 (G-G-S-M). Sabe-se que a natureza (hidrofílico/hidrofóbico) dos resíduos nos filtros de seleção, assim como a dos vestibulos de cada lado dos motivos NPA são importantes para determinar a seletividade e pré-selecionar os substratos que passarão pelos filtros, respectivamente (SAVAGE *et al.*, 2003). No entanto, outros elementos estruturais que não interagem com o substrato (como a alça C) são necessários para facilitar o transporte destes (SAVAGE *et al.*, 2010).

A respeito do transporte de água, há relatos que a histidina (H) na hélice 5 do filtro ar/R está relacionada com a permeabilidade à água (SUI *et al.*, 2001). De modo interessante, este resíduo está presente nas duas PIP1 de *V. gigantea* (**Figura I.3**). Por outro lado, VgTIP2 possui o resíduo H na hélice 2 e não na hélice 5, uma característica que parece ser típica em aquaporinas permeáveis à água e à amônia (JAHN *et al.*, 2004; DYNOWSKI *et al.*, 2008). Ainda que clara a diferença que existe nos resíduos dos filtros de seleção entre as MIPs de *V. gigantea* (**Figura I.4C**), e dado que não se conhecem todos os elementos envolvidos na seletividade dos substratos, é indispensável testar empiricamente sua funcionalidade.

5.2. Permeabilidade da membrana à água, ureia e $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$

Apesar de inicialmente algumas PIP1s terem sido ditas como não transportadoras de água (YAMADA *et al.*, 1995; CHAUMONT *et al.*, 2000; BOTS *et al.*, 2005), hoje em dia sabe-se que a heterotetramerização das PIP1s com PIP2s é de grande relevância para sua atividade e tráfego do retículo endoplasmático para a membrana plasmática, resultando em um efeito sinérgico na permeabilidade à água (Pf) quando comparado ao Pf das PIP2s expressas isoladamente (FETTER

et al., 2004; TEMMEI *et al.* 2005; KATSUHARA *et al.*, 2007; MAHDIEH *et al.*, 2008; YANEF *et al.*, 2014; JOZEFKOWICZ *et al.*, 2016).

Contudo, existem exceções a esta regra, uma vez que, foi visto que nem todas as PIP1s requerem da associação com PIP2s para serem permeáveis à água (teoricamente elas estariam na membrana plasmática para referida atividade) (KAMMERLOHER *et al.*, 1994; BIELA *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2000; MARIN-OLIVIER *et al.* 2000 GASPAR *et al.*, 2003; PICAUD *et al.*, 2003; SUGA & MAESHIMA, 2004; MAHDIEH *et al.*, 2008) ou solutos, como ureia e glicerol (ECKERT *et al.*, 1999; SIEFRITZ *et al.*, 2001, BIELA *et al.*, 1999; GASPAR *et al.*, 2003; PICAUD *et al.*, 2003). Não obstante, estudos subsequentes feitos com as mesmas MIPs de alguns desses trabalhos mostraram resultados contrários (SHELDEN *et al.*, 2009, HECKWOLF *et al.*, 2011; MATSUMOTO *et al.*, 2009). Dessa maneira, é necessário confirmar os dados para as poucas PIP1s reportadas como transportadoras de água quando expressas isoladamente.

Dos resultados obtidos nesta pesquisa foi possível observar que as aquaporinas VgPIP1;2 e VgPIP1;5, quando expressas isoladamente em ovócitos de *X. laevis*, não são permeáveis à água. De maneira interessante, quando as PIP1 de *V. gigantea* foram co-expressas com uma PIP2 de milho (ZmPIP2;5), uma aquaporina já caracterizada como transportadora de água, foi possível observar um efeito sinérgico no transporte de água (**Figura I.5**) e sua correta localização na membrana plasmática dos ovócitos (**Figura I.6**). Além disso, embora pouco explorado, as TIPs podem apresentar também efeito sinérgico no Pf através da interação com outras TIPs (UTSUGI *et al.*, 2015). Ainda que a co-expressão com outra TIP não tenha sido testada neste trabalho, foi possível observar que a VgTIP2 sozinha foi capaz de transportar água (**Figura I.5**) e se localizar na membrana plasmática (**Figura I.6**). Mais ainda, VgTIP2 apresentou um Pf cinco vezes maior que o das PIP1 de *V. gigantea* (VgPIP1;2+PIP2 e VgPIP1;5+PIP2).

Cabe salientar que vários estudos têm mostrado que nem todas as PIP1s são capazes de interagir com PIP2s e/ou ter um efeito sinérgico na permeabilidade à água, tais são os casos da OsPIP1;3 com OsPIP2;3 de arroz (MATSUMOTO *et al.*, 2009), a ZmPIP1;1 com ZmPIP2;5 de milho (FETTER *et al.*, 2004), a PvPIP1;1 com PvPIP2;2 de feijão e a BvPIP1;1 com BvPIP2;1 de beterraba (JOZEFKOWICZ *et al.*, 2013), dentre outros. Esses resultados sugerem que os graus de funcionalidade (por exemplo, transporte de água) das PIP1s podem ser diferentes segundo a interação que estas estabeleçam com determinadas PIP2s (SECCHI & ZWIENIECKI, 2010; HORIE *et al.*, 2011). Mais ainda, recentemente foi visto que os heterotetrâmeros podem se juntar em diferentes proporções estequiométricas (3:1, 1:3 ou 2:2) dependendo da expressão relativa das PIP1 e PIP2, levando a mudanças na atividade (JOZEFKOWICZ *et al.*, 2016). Além das PIP2s

permitirem o tráfego das PIP1s para a membrana plasmática, a interação PIP1-PIP2 muda a sensibilidade das PIP1 ao pH (para valores menos ácidos) e desta maneira regulam o *gating* da PIP1 e, por consequência, sua atividade (YANEFF *et al.*, 2014).

YANEFF e colaboradores (2015) sugeriram que as associações PIP1-PIP2 devem ser tratadas como unidades, devido aos diferentes graus de resposta encontrados para determinado par PIP1-PIP2. Embora não tenham sido clonadas aquaporinas da subfamília PIP2 em *V. gigantea*, os resultados obtidos sugerem que devem existir ortólogos de PIP2s em *V. gigantea* capazes de interagir e regular o tráfego de VgPIP1;2 e VgPIP1;5 para a membrana, podendo assim, mediar o transporte de água através das membranas (**Figuras I.5 e I.6**). Mais ainda, esses resultados podem sugerir que a interação de PIP1;2 com ortólogos de PIP2;5 é conservada pelo menos em monocotiledôneas (como foi visto para a interação entre ZmPIP1;2 e ZmPIP2;5 em milho). Também faltaria comprovar se a interação de VgPIP1;5 com o ortólogo PIP2;5 também seria conservada em milho (ZmPIP1;5+ZmPIP2;5).

Segundo os dados *in silico* obtidos neste trabalho, VgPIP1;5 e VgTIP2 foram sugeridas como transportadoras de vários solutos, como a ureia. Entretanto, ao expressar estas MIPs em ovócitos de *Xenopus* e testar a permeabilidade à ureia, apenas a VgTIP2 se mostrou capaz de facilitar o transporte desse soluto (**Figura I.7**). De maneira interessante, DYNOWSKI e colaboradores (2008) demonstraram que outras regiões próximas ao filtro de seleção são importantes também para determinar a seletividade da aquaporina. Nesse mesmo trabalho, os autores mostraram que o resíduo de glicina (que costuma ser treonina nas aquaporinas não permeáveis à ureia) antes na alça E do filtro ar/R é de grande importância para a permeabilidade à ureia. Este resíduo está presente em VgTIP2, mas é trocado por treonina na VgPIP1;5 (e VgPIP1;2), o que explicaria em parte a não permeabilidade das VgPIP1s à ureia (resíduos destacados em azul-marinho na **Figura I.3A**). Posteriormente, a capacidade de VgTIP2 em transportar ureia foi confirmada através da transformação da linhagem mutante de levedura YNVW1 (deficiente na absorção de ureia) com as aquaporinas de *V. gigantea*. Os resultados, usando este outro sistema heterólogo, também indicaram à VgTIP2 como a única capaz de transportar ureia (**Figura I.8**).

As TIPs constituem aproximadamente 40% da proteína total da membrana vacuolar (MAESHIMA, 2001) e são caracterizadas como elementos chave na remobilização do N para dentro e fora do vacúolo, de forma a evitar a toxicidade e manter o balanço de compostos nitrogenados no citossol (GERBEAU *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2003; JAHN *et al.*, 2004). Embora várias TIPs já tenham sido caracterizadas no tonoplasto como transportadoras de ureia

(GERBEAU *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2003; GU *et al.*, 2012), outras (AtTIP1;3 e AtTIP5;1) têm sido encontradas na mitocôndria facilitando a passagem da ureia para o citossol (SOTO *et al.*, 2008). Curiosamente, a AtTIP1;3 também foi encontrada no tonoplasto e membrana plasmática de embriões de sementes de *Arabidopsis* (GATTOLIN *et al.*, 2011), esses resultados sugerem a existência de diferentes mecanismos de tráfego para TIPs e uma possível importância da localização destas na membrana plasmática para compensar a ausência ou baixa expressão de PIPs em determinados tecidos e estágios ontogenéticos.

A análise da localização subcelular *in silico* da VgTIP2 usando o servidor TMHMM apontou que sua localização principal seria no tonoplasto (**Tabela I.3**). Contudo, dado que as TIPs têm sido encontradas em outro tipo de membranas além do tonoplasto, questionou-se se VgTIP2 poderia estar localizada na membrana plasmática e, nesse sentido, mediar a o transporte de ureia do meio externo para dentro da célula. Para confirmar a localização putativa da VgTIP2 na membrana plasmática, a proteína de fusão YFP na posição N- ou C-terminal da aquaporina foi expressa transientemente em células de tabaco. Ambas as fusões YFP-VgTIP2 e VgTIP2-YFP foram detectadas principalmente no retículo endoplasmático (RE) e escassamente na membrana plasmática (**Figura I.10**). A localização não usual de VgTIP2 no caminho secretório (RE) pode ser devido a: (1) alguns dos componentes necessários para o tráfego da TIP2 para seu destino final (tonoplasto ou membrana plasmática) não estarem presentes nas células de tabaco sendo que estariam originalmente nas células de *V. gigantea*; ou (2) a fusão do YFP no N- ou C-terminal pode estar interferindo na sinalização de VgTIP2 para seu destino final (tonoplasto ou membrana plasmática) e consequentemente em sua atividade de transporte de água, como foi visto em ovócitos de *Xenopus* expressando YFP-VgTIP2 (**Anexo 3**).

Além disso, as TIPs também têm sido relatadas como transportadores de amônia (NH_3) (JAHN *et al.*, 2004, LOQUÉ *et al.*, 2005, DYNOWSKI *et al.*, 2008). Apesar dos dados *in silico* apontarem VgTIP2 como permeável ao NH_3 e ureia, não houve um melhor crescimento da linhagem mutante de levedura 31019b quando transformada com VgTIP2 em meio contendo <5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 7,5 (em que a formação de NH_3 é favorecida). De maneira interessante, VgPIP1;2 mostrou ser capaz de complementar o crescimento de levedura em pH 5,5, no qual o amônio (NH_4^+) estaria mais disponível do que o NH_3 (**Figura I.9**), indicando que VgPIP1;2 poderia facilitar a difusão de amônio. Sabe-se que os motivos NPA (principalmente o resíduo de asparagina) eficientemente excluem a passagem de H^+ (SAVAGE *et al.*, 2010), assim como, a arginina (R) do filtro ar/R também contribui com a exclusão de prótons e cátions (WU *et al.*, 2009). Em estudos anteriores, HOLM e colaboradores (2005) hipotetizaram que a NH_3 poderia ser protonada no canal das aquaporinas formando NH_4^+ , sendo o amônio transportado para

dentro da célula através das forças de atração geradas pelo ambiente mais negativo do citoplasma. Entretanto, em 2016 surgiu uma nova hipótese sobre o transporte de NH_3 através das aquaporinas: KIRSCHT e colaboradores (2016) baseados em simulações e na estrutura cristalográfica da AtTIP2;1, uma conhecida aquaporina transportadora de amônia, especularam que a existência de um poro abaixo da alça C, que está continuamente solvatado, ajudaria na desprotonação do NH_4^+ acumulado na superfície da proteína, sendo o próton resultante conduzido para fora do canal principal da aquaporina (via mecanismo de Grotthuss) através do poro adjacente, enquanto que a amônia gerada (NH_3) seria transportada através do canal principal da aquaporina. Esses resultados indicam que o amônio é, em última instância, transportado através das aquaporinas na forma de NH_3 devido à sua desprotonação. No caso da VgPIP1;2 um mecanismo similar poderia estar acontecendo, em um meio onde é favorecido o acúmulo de amônio (pH 5,5).

Apesar de não ter sido testado funcionalmente, estudos *in silico* indicaram a VgPIP1;5 como transportadora de CO_2 . De maneira interessante, os resultados sugerem que a *V. gigantea* poderia ter um sistema muito eficiente não somente de transporte de ureia, mas também seria eficiente no transporte dos produtos da hidrólise de ureia, amônio e CO_2 , otimizando o metabolismo de ureia nessa espécie.

Para obter mais informações sobre o metabolismo do nitrogênio e a sua relação com as aquaporinas, análises de expressão gênica de *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* e *VgTIP2* estão sendo conduzidas em plantas de *V. gigantea* tratadas com ureia ou amônio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASCAL, F.; IRISARRI, I.; ZARDOYA, R. (2014). Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochim Biophys Acta* 1840:1468–1481.
- AGRE, P.; SASAKI, S.; CHRISPEELS, J. (1993). Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am J Physiol Ren Physiol*. 265: F461.
- ANDERBERG, H.I.; KJELLBOM, P.; JOHANSON, U. (2012). Annotation of *Selaginella moellendorffii* major intrinsic proteins and the evolution of the protein family in terrestrial plants. *Front Plant Sci* 3:33.
- BATOKO, H.; ZHENG, H-Q.; HAWES, C.; MOORE, I. (2000). A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal golgi movement in plants. *The Plant Cell*. 12: 2201–2217.
- BESSERER, A.; BURNOTTE, E.; BIENERT, G.P.; CHEVALIER, A.S.; ERRACHID, A.; GREFFEN, C.; BLATT, M.R.; CHAUMONT, F. (2012). Selective regulation of maize plasma membrane aquaporin trafficking and activity by the SNARE SYP121. *Plant Cell*. 24, 3463–3481.
- BIELA, A.; GROTE, K.; OTTO, B.; HOTH, S.; HEDRICH, R.; KALDENHOFF, R. (1999). The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J* 18: 565–570.
- BIENERT, J.P.; BIENERT, M.D.; JAHN, T.P.; BOUTRY, M.; CHAUMONT, F. (2011). Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *The Plant J*. 66: 306–317.
- BIENERT, G.P.; CAVEZ, D.; BESSERER, A.; BERNY, M.C.; GILIS, D.; ROOMAN, M.; CHAUMONT, F. (2012). A conserved cysteine residue is involved in disulfide bond formation between plant plasma membrane aquaporin monomers. *Biochem J*. 445:101–111.
- BOTS, M.; FERON, R.; UEHLEIN, N.; WETERINGS, K.; KALDENHOFF, R.; MARIANI, T. (2005). PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *J. Exp. Bot.* 56: 113–121.
- CAMBUÍ, C.A. (2009). Absorção e assimilação de uréia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*. Tese. Instituto de Biociências IBUSP. São Paulo. Brasil.
- CARBREY, J.M. & AGRE, P. (2009). Discovery of the aquaporins and development of the field. *Aquaporins, Handbook of Experimental Pharmacology*, 190: 3-28.
- CARVAJAL, M.; COOKE, D.T.; CLARKSON, D.T. (1996). Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function. *Planta* 199: 372–381.
- CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; JUNG, R.; CHRISPEELS, M.J. (2000). plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol*. 122: 1025–1034.
- CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; WOJCIK, E.; CHRISPEELS, M.J.; JUNG R. (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol*. 125:1206-1215.

- CHAUMONT, F.; TYERMAN, S.D. (2014). Aquaporins: Highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiol.* 164: 1600–1618.
- CHRISPEELS, J. & MAUREL, C. (1994). Aquaporins: The molecular basis of facilitated water movement through living plant cells?. *Plant Physiol.* 105: 9-13.
- CLARKSON, D.T.; CARVAJAL, M.; HENZLER, T.; WATERHOUSE, R.N.; SMYTH, A.J.; COOKE, D.T.; STEUDLE, E. (2000). Root hydraulic conductance: Diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *J. Exp. Bot.* 51: 61–70.
- COOPER, G.J.; ZHOU, Y.; BOUYER, P.; GRICHTCHENKO, I.I.; BORON, W.F. (2002). Transport of volatile solutes through AQP1. *J. Physiol.* 542: 17–29.
- DANIELS, M.J.; CHRISPEELS, M.J.; YEAGER, M. (1999). Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography. *J Mol Biol.* 294:1337–1349.
- DANIELSON, J.H.A. & JOHANSON, U. (2008). Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology.* 8(45): 1-15.
- DAY, R.E.; KITCHEN, P.; OWEN, D. S.; BLAND, C.; MARSHALL, L.; CONNER, A.C.; BILL, R.M., CONNER, M.T. (2014). Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840: 1492–1506.
- DYNOWSKI, M.; MAYER, M.; MORAN, O.; LUDEWIG, U. (2008). Molecular determinants of ammonia and urea conductance in plant aquaporin homologs. *FEBS Lett.* 582: 2458–2462.
- ECKERT, M.; BIELA, A.; SIEFRITZ, F.; KALDENHOFF, R. (1999). New aspects of plant aquaporin regulation and specificity. *J. Exp. Bot.* 50 (339):1541–1545.
- ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENOM, M.A.; MADHUSUDHAN, M.S.; ERAMIAN, D., SHEN, M.Y.; PIEPER, U.; SALI, A. (2007). Comparative protein structure modeling using modeller. In *Curr Protoc Protein Sci.* Chapter 2. Unit 2.9.
- FETTER, K.; VAN WILDER, V.; MOSHELION, M.; CHAUMONT, F. (2004). Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell.* 16: 215–228.
- FISCHER, G.; KOSINSKA-ERIKSSON, U.; APONTE-SANTAMARÍA, C.; PALMGREN, M.; GEIJER, C.; HEDFALK, K.; HOHMANN, S.; DE GROOT, B.L.; NEUTZE, R.; LINDKVIST-PETERSSON, K. (2009). Crystal Structure of a yeast aquaporin at 1.15 Å reveals a novel gating mechanism. *PLoS Biol.* 7(6): e1000130.
- FRICK, A.; JÄRVÅ, M.; TÖRNROTH-HORSEFIELD, S. (2013). Structural basis for pH gating of plant aquaporins. *FEBS Lett.* 587:989–993.
- FROGER, A.; TALLUR, B.; THOMAS, D.; DELAMARCHE, C. (1998). Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Science:* 71458-1468.
- FU, D.; LIBSON, A.; MIERCKE, L.J.; WEITZMAN, C.; NOLLERT, P.; KRUCINSKI, J.; STROUD, R.M. (2000). Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science.* 290: 481–486.

- GASPAR, M.; BOUSSER, A.; SISOËFF, I.; ROCHE, O.; HOARAU, J.; MAHE, A. (2003). Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporin transporting water and urea. *Plant. Sci.* 165: 21-31.
- GATTOLIN, S.; SORIEUL, M.; FRIGERIO, L. (2011). Mapping of tonoplast intrinsic proteins in maturing and germinating arabidopsis seeds reveals dual localization of embryonic tips to the tonoplast and plasma membrane. *Mol Plant* 4: 180–189.
- GERBEAU, P.; GÜCLÜ, J.; RIPOCHE, P.; MAUREL, C. (1999). Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J.* 18: 577–87.
- GOLDBERG, T.; HAMP, T.; ROST, B. (2012). LocTree2 predicts localization for all domains of life. *Bioinformatics.* 28(18): i458–i465.
- GOLDBERG, T.; HECHT, M.; HAMP, T.; KARL, T.; YACHDAV, G.; AHMED, N.; ALTERMANN, U.; ANGERER, P.; ANSORGE, S.; BALASZ, K.; BERNHOFER, M.; BETZ, A.; CIZMADIJA, L.; DO, K.T.; GERKE, J.; GREIL, R.; JOERDENS, V.; HASTREITER, M.; HEMBACH, K.; HERZOG, M.; KALEMANOV, M.; KLUGE, M.; MEIER, A.; NASIR, H.; NEUMAIER, U.; PRADE, V.; REEB, J.; SOROKOUMOV, A.; TROSHANI, I.; VORBERG, S.; WALDRAFF, S.; ZIERER, J.; NIELSEN, H.; ROST, B. (2014). LocTree3 prediction of localization. *Nucleic Acids Res.* 42(Web Server issue):W350-5.
- GORSKA, A.; YE, Q.; HOLBROOK, N.M.; ZWIENIECKI, M.A. (2008). Nitrate control of root hydraulic properties in plants: Translating local information to whole plant response. *Plant Physiol.* 148: 1159–1167.
- GU, R.; CHEN, X.; ZHOU, Y.; YUAN, L. (2012). Isolation and characterization of three maize aquaporin genes, *ZmNIP2;1*, *ZmNIP2;4* and *ZmTIP4;4* involved in urea transport. *BMB reports*: 96-101.
- HAMANN, T. & MOLLER, B. L. (2007). Improved cloning and expression of cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in yeast. *Protein Express Purif.* 56: 121–127.
- HECKWOLF, M.; PATER, D.; HANSON, D.T.; KALDENHOFF, R. (2011). The *Arabidopsis thaliana* aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO₂ transport facilitator. *Plant J.* 67: 795–804.
- HÖFTE, H.; HUBBARD, L.; REIZER, J.; LUDEVID, D.; HERMAN, E.M.; CHRISPEELS, M.J. (1992). Vegetative and seed-specific forms of tonoplast intrinsic protein in the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 99:561–570.
- HOLM, L.M.; JAHN, T.P.; MØLLER, A.L.B.; SCHJOERRING, J. K.; FERRI, D.; KLAERKE, D.A.; ZEUTHEN, T. (2005). NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 450: 415–428.
- HORIE, T.; KANEKO, T.; SUGIMOTO, G.; SASANO, S.; PANDA, S.K.; SHIBASAKA, M.; KATSUHARA, M. (2011). Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots. *Plant Cell Physiol* 52: 663–675.
- HOVE, R.M. & BHAVE, M. (2011). Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. *Plant Mol Biol.* 75: 413–430.
- HWANG, J.H.; ELLINGSON, S.R.; ROBERTS, D.M. (2010). Ammonia permeability of the soybean nodulin 26 channel. *FEBS Lett.* 584: 4339–4343.

- INSELSBACHER, E.; CAMBUÍ, C.A.; RICHTER, A.; STANGE, C.F.; MERCIER, H.; WANEK, W. (2007). Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytol* 175(2):311-320.
- JAHN, T.P.; MOLLER, A.L.; ZEUTHEN, T.; HOLM, L.M.; KLAERKE, D.A.; MOHSIN, B.; KÜHLBRANDT, W.; SCHJOERRING, J.K. (2004). Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett.* 574: 31–36.
- JOZEFKOWICZ, C.; ROSI, P.; SIGAUT, L.; SOTO, G.; PIETRASANTA, L.I.; AMODEO, G.; ALLEVA, K. (2013). Loop A is critical for the functional interaction of two *Beta vulgaris* PIP aquaporins. *PLoS One* 8:e57993.
- JOZEFKOWICZ, C.; SIGAUT, L.; SCOCHERA, F.; SOTO, G.; AYUB, N.; PIETRASANTA, L.I.; AMODEO, G.; GONZÁLEZ-FLECHA F.L.; ALLEVA, K. (2016). PIP water transport and its pH dependence are regulated by tetramer stoichiometry. *Biophys J* 110:1312–1321.
- JUNG, J.S.; PRESTON, G.M.; SMITH, B.L.; GUGGINO, W.B.; AGRE, P. (1994). Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J Biol Chem.* 269: 14648–14654.
- KAMMERLOHER, W.; FISCHER, U.; PIECHOTTKA, G.P.; SCHÄFFNER, A.R. (1994). Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J.* 6, 187–199.
- KATSUHARA, M. (2007). Molecular mechanisms of water uptake and transport in plant roots: research progress with water channel aquaporins. *Plant Root* 1:22–26.
- KIRSCHT, A.; KAPTAN, S.S.; BIENERT, K.P.; CHAUMONT, F.; NISSEN, P.; DE GROOT, B.L.; KJELLBOM, P.; GOURDON, P.; JOHANSON, U. (2016). Crystal structure of an ammonia-permeable aquaporin. *PLoS Biol.* 14: e1002411.
- KLEB, F.; WOLF, M.; SAUER, N. (2003). A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by *CpNIP1*, a Nod26-like protein from zucchini (*Cucurbita pepo* L.), and by *Arabidopsis thaliana* δ -TIP or γ -TIP. *FEBS Lett.* 547:69-74.
- KUKULSKI, W.; SCHENK, A.D.; JOHANSON, U.; BRAUN, T.; DE GROOT, B.L.; FOTIADIS, D.; KJELLBOM, P.; ENGEL, A. (2005). The 5A structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1. *J Mol Biol.* 350:611–616.
- LI, L.G.; LI, S.F.; TAO, Y.; KITAGAWA, Y. (2000). Molecular cloning of a novel water channel from rice: its products expression in *Xenopus* oocytes and involvement in chilling tolerance. 154(1): 43-51.
- LI, G.; SANTONI, V.; MAUREL, C. (2014). Plant aquaporins: roles in plant physiology. *Biochim Biophys Acta* 1840:1574–1582.
- LI, G.; TILLARD, P.; GOJON, A.; MAUREL, C. (2016). Dual regulation of root hydraulic conductivity and plasma membrane aquaporins by plant nitrate accumulation and high-affinity nitrate transporter NRT2.1. *Plant Cell Physiol.* 57(4): 733–742.
- LIU, H.Y.; SUN, W.N.; SU, W.A.; TANG, Z.C. (2006). Co-regulation of water channels and potassium channels in rice. *Physiol. Plant.* 128: 58–69.
- LIU, L.H.; LUDEWIG, U.; GASSERT, B.; FROMMER, W.B.; VON WIRÉN, N. (2003). Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133:1220–28.

- LOPEZ, F.; BOUSSER, A.; SISOEFF, I.; GASPAR, M.; LACHAISE, B.; HOARAU, J.; MAHE, A. (2003). Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. *Plant Cell Physiol* 44: 1384–1395.
- LOQUÉ, D.; LUDEWIG, U.; YUAN, L.; VON WIRÉN, N. (2005). Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiol.* 137:671–80.
- LUANG, S. & HRMOVA, M. (2017). Structural basis of the permeation function of plant aquaporins. In: Chaumont, C & Tyerman, S. (2017). *Plant Aquaporins*. Springer International Publishing.
- MA, J.F.; TAMAI, K.; YAMAJI, N.; MITANI, N.; KONISHI, S.; KATSUHARA, M.; ISHIGURO, M.; MURATA, Y.; YANO, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature* 440: 688–691.
- MAESHIMA M. (2001). Tonoplast transporters: Organization and function. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 52: 469–497.
- MAHDIEH, M.; MOSTAJERAN, A.; HORIE, T.; KATSUHARA, M. (2008) Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell Physiol.* 49, 801–813.
- MARIN-OLIVIER, M.; CHEVALIER, T.; FOBIS-LOISY, I.; DUMAS, C.; GAUDE, T. (2000). Aquaporin PIP genes are not expressed in the stigma papillae in *Brassica oleracea*. *Plant J* 24: 231–240.
- MARINI, A.M.; SOUSSI-BOUDEKOU, S.; VISSERS, S.; ANDRE, B. (1997). A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cellular Biol.* 17: 4282–4293.
- MATSUMOTO, T.; LIAN, H.L.; SU, W.A.; TANAKA, D.; LIU, C.W.; IWASAKI, I.; KITAGAWA, Y. (2009). Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice. *Plant Cell Physiol.* 50, 216–229.
- MAUREL, C. (1997). Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 399–429.
- MAUREL, C.; SANTONI, V.; LUU, D.T.; WUDICK, M.M.; VERDOUCQ, L. (2009). The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 690–698.
- MITANI, N.; YAMAJI, N.; MA, J.F. (2009). Identification of maize silicon influx transporters. *Plant Cell Physiol.* 50: 5–12.
- NIEMIETZ, C.M.; TYERMAN, S.D. (1997). Characterization of water channels in wheat root membrane vesicles. *Plant Physiol* 115:561–567.
- NORONHA, H.; AGASSE, A.; MARTINS, A.P.; BERNY, M.C.; GOMES, D.; ZARROUK, O.; THIEBAUD, P.; DELROT, S.; SOVERAL, G.; CHAUMONT, F.; GERÓS, H. (2014). The grape aquaporin VvSIP1 transports water across the ER membrane. *J Exp Bot* 65:981–993.
- NOUR-ELDIN, H.H.; HANSEN, B.G.; NORHOLM, M.H.; JENSEN, J.K.; HALKIER, B.A. (2006). Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res.* 34: e122.
- OTTO, B.; UEHLEIN, N.; SDORRA, S.; FISCHER, M.; AYAZ, M.; BELASTEGUI-MACADAM, X.; HECKWOLF, M.; LACHNIT, M.; PEDE, N.; PRIEM, N.; REINHARD, A.; SIEGFART, S.; URBAN, M.; KALDENHOFF, R.

- (2010). Aquaporin tetramer composition modifies the function of tobacco aquaporins. *J Biol Chem.* 285: 31253–31260.
- PICAUD, S.; BECQ, F.; DÉDALDÉCHAMP, F.; AGEORGES, A.; DELROT, S. (2003). Cloning and expression of two plasma membrane aquaporins expressed during the ripening of grape berry. *Funct. Plant Biol.* 30: 621–630.
- PRESTON, G.M.; CARROLL, T.P.; GUGGINO, W.B.; AGRE, P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein, *Science* 256: 385–387.
- REDDY, P.S.; RAO, T.S.R.B.; SHARMA, K.K.; VADEZ, V. (2015). Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Sorghum bicolor* (L.). *Plant Gene* 1:18–28.
- ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 5: 725–738.
- SUGA, S. & MAESHIMA, M. (2004). Water channel activity of radish plasma membrane aquaporins heterologously expressed in yeast and their modification by site-directed mutagenesis. *Plant Cell Physiol* 45: 823–830.
- SAKURAI, J.; ISHIKAWA, F.; YAMAGUCHI, T.; UEMURA, M.; MAESHIMA, M. (2005). Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol.* 46: 1568–1577.
- SANDAL, N.N. & MARCKER, K. A. (1988). Soybean nodulin 26 is homologous to the major intrinsic protein of the bovine lens fiber membrane. *Nucleic Acids Res.* 16(19): 9347.
- SAVAGE, D.F.; EGEE, P.F.; ROBLES-COLMENARES, Y.; O'CONNELL, J.D.3RD.; STROUD, R.M. (2003). Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5Å X-ray structure of aquaporin Z. *PLoS Biol* 1:E72.
- SAVAGE, D.F.; O'CONNELL, J.D. 3RD.; MIERCKE, L.J.; FINER-MOORE, J.; STROUD, R.M. (2010). Structural context shapes the aquaporin selectivity filter. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:17164–17169.
- SCHIESTL, R.H. & GIETZ, R.D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet.* 16: 339.
- SHELDEN, M.C.; HOWITT, S.M.; KAISER, B.N.; TYERMAN, S.D. (2009). Identification and functional characterisation of aquaporins in the grapevine, *Vitis vinifera*. *Funct. Plant Biol.* 36: 1065–1078.
- SECCHI, F. & ZWIENIECKI, M.A. (2014). Down-regulation of plasma intrinsic protein1 aquaporin in poplar trees is detrimental to recovery from embolism. *Plant Physiol.* 164: 1789–1799.
- SOTO, G.; ALLEVA, K.; MAZZELLA, M.A.; AMODEO, G.; MUSCHIETTI, J.P. (2008). AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed Arabidopsis pollen-specific aquaporins, transport water and urea. *FEBS Lett.* 582: 4077–4082.
- SUI, H.; HAN, B.G.; LEE, J.K.; WALIAN, P.; JAP, B.K. (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature.* 414: 872–878.
- TAKANO, T.; NOGUCHI, K.; YASUMORI, M.; KOBAYASHI, M.; GAJDOS, Z.; MIWA, K.; HAYASHI, H.; YONEYAMA, T.; FUJIWARA, T. (2002). Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature* 420: 337–340.

- TAKANO, J.; WADA, M.; LUDEWIG, U.; SCHAAF, G.; VON WIRÉN, N.; FUJIWARA, T. (2006). The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18: 1498–1509.
- TAKANO, J.; MIWA, K.; FUJIWARA, T. (2008). Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends Plant Sci.* 13: 451–457.
- TEMMEI, Y.; UCHIDA, S.; HOSHINO, D.; KANZAWA, N.; KUWAHARA, M.; SASAKI, S.; TSUCHIYA, T. (2005). Water channel activities of *Mimosa pudica* plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation. *FEBS Lett* 579:4417–4422.
- TÖRNROTH-HORSEFIELD, S.; WANG, Y.; HEDFALK, K.; JOHANSON, U.; KARLSSON, M.; TAJKHORSHID, E.; NEUTZE, R.; KJELLBOM, P. (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439: 688–694.
- TÖRNROTH-HORSEFIELD, S.; HEDFALK, K.; FISCHER, G.; LINDKVIST-PETERSSON, K.; NEUTZE, R. (2010). Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. *FEBS Lett.* 584:2580–2588.
- TSUKAGUCHI, H.; SHAYAKUL, C.; BERGER, U.V.; MACKENZIE, B.; DEVIDAS, S.; GUGGINO, W. B.; VAN HOEK, A.N.; HEDIGER, M.A. (1998). Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J Biol Chem.* 273(38): 24737–24743.
- UEHLEIN, N.; LOVISOLO, C.; SIEFRITZ, F.; KALDENHOFF, R. (2003). The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 425:734–737.
- UEHLEIN, N.; OTTO, B.; HANSON, D.T.; FISCHER, M.; MCDOWELL, N.; KALDENHOFF, R. (2008). Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *Plant Cell.* 20: 648–657.
- UTSUGI, S.; SHIBASAKA, M.; MAEKAWA, M.; KATSUHARA, M. (2015). Control of the water transport activity of barley HvTIP3;1 specifically expressed in seeds. *Plant Cell Physiol.* 56(9): 1831–1840.
- VERDOUCQ, L.; GRONDIN, A.; MAUREL, C. (2008). Structure-function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons. *Biochem J* 415:409–416.
- WALLACE, I.S.; CHOI, W.G.; ROBERTS, D.M. (2006). The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758: 1165–1175.
- WANG, Y.H.; GARVIN, D.F.; KOCHIAN, L.V. (2001). Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiol.* 127: 1323–1323.
- WANG, M.; DING, L.; GAO, L.; LI, Y.; SHEN, Q.; GUO, S. (2016). The interactions of aquaporins and mineral nutrients in higher plant. *International Journal of molecular sciences.* 17: 1229.
- WU, B.; STEINBRONN, C.; ALSTERFJORD, M.; ZEUTHEN, T.; BEITZ, E. (2009). Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *The EMBO Journal* 28: 2188–2194.
- YAMADA, S.; KATSUHARA, M.; KELLY, W.B.; MICHALOWSKI, C.B.; BOHNERT, H.J. (1995). A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7:1129–1142.

- YANEFF, A.; SIGAUT, L.; MARQUEZ, M.; ALLEVA, K.; PIETRASANTA, L.I.; AMODEO, G. (2014). Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: 231–236.
- YANEFF, A.; VITALI, V.; AMODEO, G. (2015). PIP1 aquaporins: Intrinsic water channels or PIP2 aquaporin modulators?. *FEBS Lett* 589: 3508–3515.
- YANG, H.; MENZ, J.; HAUSSERMANN, I.; BENZ, M.; FUJIWARA, T.; LUDEWIG, U. (2015a). High and low affinity urea root uptake: involvement of NIP5;1. *Plant Cell Physiol* 56(8):1588–1597.
- YANG, J.; YAN, R.; ROY, A.; XU, D.; POISSON, J.; ZHANG, Y. (2015b). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*. 12: 7-8.
- ZELAZNY, E.; BORST, J. W.; MUYLEAERT, M.; BATOKO, H.; HEMMINGA, M.A.; CHAUMONT, F. (2007). FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:12359–12364.
- ZHANG, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9: 40.
- ZHANG, L.; YAN, J.; VATAMANIUK, O.K.; DU, X. (2016). CsNIP2;1 is a plasma membrane transporter from *Cucumis sativus* that facilitates urea uptake when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 57(3): 616–629.

CAPÍTULO II

ANÁLISE DA ASSIMILAÇÃO DE UREIA EM PLANTAS DE *Vriesea gigantea* COM BAIXA ATIVIDADE DA UREASE

1. INTRODUÇÃO

1.1. Urease, estrutura e função

A urease é uma metaloenzima (com íons níquel no seu sítio ativo) chave no catabolismo da ureia. Essa enzima catalisa a hidrólise de ureia para gerar amônia e carbamato, este último, em pH fisiológico, é hidrolisado espontaneamente para formar CO₂ e uma segunda molécula de amônio (**Figura II.1**). Estima-se que a degradação espontânea da ureia tenha uma meia-vida de 520 anos para gerar amônia e carbamato, enquanto que a meia-vida da ureia catalisada pela urease é 20 milissegundos (CALLAHAN *et al.*, 2005). Assim, a urease é uma das enzimas hidrolases mais rápidas conhecidas.

Em 1926, a urease de *Canavalia ensiformis* foi a primeira enzima em ser cristalizada (SUMNER, 1926), rendendo a James B. Sumner o prêmio Nobel em Química. Entretanto, somente 83 anos depois foi possível determinar sua estrutura (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010). Atualmente, continua sendo a única urease em plantas com a estrutura determinada.

Figura II.1: Reação catalisada pela urease (E.C 3.5.1.5). A urease hidrolisa a ureia em carbamato e amônia. Posteriormente, em pH fisiológico, o carbamato é hidrolisado, produzindo CO₂ e amônio. Assim, na reação final temos que para cada molécula de ureia são geradas duas moléculas de amônio e uma de CO₂. Figura modificada de WITTE, 2011.

Dois tipos diferentes de enzimas são capazes de degradar a ureia: a urease (E.C 3.5.1.5)(ou ureia amidohidrolase) e a ureia amidolase. A urease tem sido encontrada em diversos organismos (bactérias, plantas e alguns fungos)(MOBLEY *et al.*, 1995), embora aparentemente esteja ausente em animais. Em plantas vasculares, a assimilação da ureia ocorre exclusivamente por meio da urease, enquanto que a ureia amidolase tem sido reportada somente para levedura (*S. cerevisiae*), algas e pelo menos uma bactéria (SIRKO & BRODZIK, 2000; KANAMORI *et al.*, 2004). Ainda que a primeira urease tenha sido descoberta em plantas, seus mecanismos de ação são conhecidos apenas para ureases bacterianas (*Klebsiella aerogenes*,

Bacillus pasteurii e *Helicobacter pylori*), uma vez que estas últimas estão relacionadas com doenças em animais e humanos e, portanto, têm sido alvos de estudo (BURNE & CHEN, 2000). Contudo, devido à alta similaridade de sequência entre as ureases de plantas e bactérias, hoje em dia acredita-se que os mecanismos de ação ureolítica são conservados (FOLLMER, 2008).

Em plantas, a urease é constituída por um dímero de homotrímeros, totalizando 6 sítios ativos por proteína ativa, onde cada sítio ativo possui dois íons níquel (DIXON *et al.*, 1975; BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010; ZAMBELLI *et al.*, 2011). Cada monômero de urease é formado por uma única cadeia polipeptídica de 90kD, que contem 4 domínios (dois domínios $\alpha\beta$, um domínio β e um domínio TIM-barril) que formam uma estrutura em forma de T. Posteriormente, os monômeros se associam para formar um trímero, o qual pode-se dimerizar gerando um hexâmero (**Figura II.2**). Adicionalmente, a urease possui na sua estrutura uma aba móvel que modula a entrada do substrato no sítio ativo (JABRI *et al.*, 1995; MONCRIEF *et al.*, 1995). Na aba, o resíduo de histidina His320 é responsável pelo estado fechado ou aberto da enzima (ZAMBELLI *et al.*, 2011).

Uma vez formada a proteína, ela precisa ser ativada para tornar-se funcional (holo-urease), processo mediado por proteínas chaperonas acessórias (WITTE *et al.*, 2005; WITTE, 2011). Durante a sua ativação, a apo-urease (urease inativa) precisa de CO₂ para carbamilar um resíduo de Lys do seu sítio ativo, local aonde irão se ligar os íons níquel muito importantes para sua atividade. Adicionalmente, para a sua ativação, também é necessária a hidrólise de GTP (ZAMBELLI *et al.*, 2011). Em plantas, estes processos são mediados pelas chaperonas UreD, UreF e UreG. Acredita-se que a UreD se liga à apo-urease e sirva como "andaime" para a interação com a UreF, a qual por sua vez interage com a UreG. Já esta última, é a responsável pela liberação dos íons níquel (WITTE & MEDINA-ESCOBAR, 2001; WITTE *et al.*, 2005; CAO *et al.*, 2010). Plantas mutantes de soja deficientes em *ureG* não apresentaram atividade ureolítica nem na isoforma ubíqua (presente em todos os tecidos), nem na isoforma embrião-específica, demonstrando que a ação da UreG é vital para a ativação da urease (FREYERMUTH *et al.*, 2000).

Figura II.2. Estrutura da urease de *Canavalia ensiformis*. A) Estado monomérico em forma de T da urease, os extremos N-e C-terminal, assim como o sitio ativo e os 4 domínios são indicados. B) Estado hexamérico da urease, os três monômeros se associam para formar um trímero em forma de triângulo. Os dois trímeros se juntam através da sua superfície plana para formar um hexâmero funcional. Figura modificada de BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010.

Além disso, ainda que a formação da apo-urease não seja comprometida pela falta de íons níquel (WINKLER *et al.*, 1983), a atividade da holo-urease diminui conforme é reduzida a concentração de níquel, sendo assim, a ativação da urease é dependente da disponibilidade de níquel (DIXON *et al.*, 1975; POLACCO, 1977). Uma vez ativa, a urease é altamente estável e insensível à perda dos íons níquel no seu sitio ativo (PARK & HAUSINGER, 1993; BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010). Entretanto, o resíduo de cisteína Cys592 (Cys319 em *K. aerogenes* ou Cys322 em *B. pasteurii*), presente na aba da urease, está envolvido em muitas

reações que causam a inibição da enzima (PEARSON *et al.*, 1997; KOT & ZABORSKA, 2006; BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010).

Nos genomas sequenciados atualmente em plantas, a urease parece ser codificada por um único gene (WITTE, 2011). Entretanto, em soja foram descritas três isoformas de urease: a embrião-específica (Eu1), expressa altamente em embriões (POLACCO & HOLLAND, 1993), a ubíqua (Eu4), expressa em todos os órgãos da planta (POLACCO *et al.*, 1985) e a SBU-III (Eu5), expressa nos primeiros momentos de desenvolvimento da raiz (POLACCO *et al.*, 2013; WIEBKESTROHM *et al.*, 2016). Cabe salientar que, apesar da alta atividade da urease embrião-específica em soja, esta atividade não parece estar relacionada com a função de hidrólise da ureia (STEBBINS *et al.*, 1991). Em vez disso, sugere-se o envolvimento dessa enzima em mecanismos de defesa. Atualmente, sabe-se que além da sua função ureolítica, as ureases de soja e *C. ensiformis* possuem propriedades inseticidas e fungicidas (FOLLMER *et al.*, 2004; BECKER-RITT *et al.*, 2007; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016). Apesar da alta similaridade das ureases de plantas com as de bactérias, apenas as de plantas possuem propriedades inseticidas e, mais ainda, esta característica é independente da sua capacidade ureolítica (FOLLMER *et al.*, 2004).

1.2. Ureia e sua assimilação em plantas

A uréia é uma molécula pequena, neutra, porém polar. Devido ao seu alto conteúdo de nitrogênio (46% de nitrogênio da massa molecular da uréia), é relativamente estável quimicamente. A maioria das fontes de ureia na natureza é decorrente da decomposição de compostos nitrogenados de organismos mortos e de excretas (WANG *et al.*, 2008). A ureia vem sendo cada vez mais caracterizada como uma fonte muito importante de nitrogênio orgânico e de carbono para as plantas. Vários estudos demonstraram a capacidade das plantas de absorverem fontes orgânicas de nitrogênio, como aminoácidos e ureia (PERSSON & NÄSHOLM, 2001; INSELSBACHER *et al.*, 2007; MÉRIGOUT *et al.*, 2008; NÄSHOLM *et al.*, 2009). Cabe salientar que a produção agrícola está baseada na aplicação de ureia como principal fertilizante, devido ao seu baixo custo e alto conteúdo de nitrogênio (46% N por massa molecular). Entretanto, mais da metade do nitrogênio aplicado na agricultura não é absorvido pelas plantas, resultando na poluição das águas e da atmosfera por amônio e óxidos de nitrogênio. As elevadas perdas de ureia (aplicada como adubo) em determinados solos são devidas à alta atividade da urease dos microorganismos (KRAJEWSKA, 2009) ou pela secreção de ureases por parte das plantas no meio externo (INSELSBACHER *et al.*, 2007; CAMBUÍ *et al.*, 2009), que rapidamente convertem a ureia a amônia, que pode ser perdida por volatilização.

No interior da célula vegetal, a ureia é gerada principalmente pela degradação da arginina pela enzima arginase (POLACCO *et al.*, 2013, WINTER *et al.*, 2015). Outras fontes de ureia em plantas, como a degradação de purinas e ureídeos, ainda são controversos, uma vez que a geração de ureia como intermediária na degradação de purinas e ureídeos não foi detectada *in vivo* em *Arabidopsis* (WERNER *et al.*, 2010). Em tecidos fonte, como folhas senescentes e sementes durante a germinação, a ureia pode ser acumulada e, posteriormente, o nitrogênio ser remobilizado para sustentar o crescimento (POLACCO *et al.*, 1993). Já em tecidos não senescentes, a ureia praticamente não se acumula, já que é metabolizada rapidamente pela urease (cuja atividade é ubíqua e constitutiva) (WINKLER, 1988; WITTE, 2011).

A ureia pode ser acumulada no vacúolo de maneira transitória para evitar a sua degradação pela urease e dessa maneira prevenir a saturação da assimilação do nitrogênio (WANG *et al.*, 2008). Como discutido no Capítulo I, a remobilização de ureia para dentro e fora do vacúolo pode ser mediada por aquaporinas do tipo TIP. Adicionalmente, a ureia também precisa ser exportada da mitocôndria para o citossol após a ação da arginase, uma vez que a urease tem localização citoplasmática (porém, no caso de *Vriesea gigantea*, foi constatado que sua localização também pode estar associada à parede celular e à membrana plasmática) (HOGAN *et al.*, 1983; WITTE & MEDINA-ESCOBAR, 2001, CAMBUÍ *et al.*, 2009; WINTER *et al.*, 2015). Embora transportadores específicos de ureia na mitocôndria não tenham sido identificados, já foram encontradas TIPs na membrana mitocondrial permeáveis à ureia (SOTO *et al.*, 2008).

Figura II.3. Reações envolvidas na assimilação do N proveniente da ureia. Em negrito indicam-se as enzimas envolvidas: urease, glutamina sintetase (GS), glutamato sintase (GOGAT), aminotransferases (AT). As siglas 2-OG e 2-AO significam 2-oxoglutarato e 2-oxoácido, respectivamente.

Uma vez que a ureia é hidrolisada pela urease a CO_2 e amônio, este último é assimilado em uma molécula de glutamato pela enzima glutamina sintetase (GS). A GS pode estar localizada

no citossol (isoforma GS1) ou plastídeos (isoforma GS2) (MIFLIN & LEA, 1980; MIFLIN & HABASH, 2002) (**Figura II.3**).

Posteriormente, a glutamato sintase (GOGAT) através de uma reação redutora, transfere o grupo amida do grupo amino da Gln para o 2-oxoglutarato, gerando assim 2 moléculas de glutamato. Esta reação usa NADH ou ferredoxina como doadores de elétrons, de acordo com a localização subcelular da GOGAT, sendo ferredoxina nos cloroplastos e NADH nos plastídeos (BOWSHER *et al.*, 2007). A geração de duas moléculas de Glu permite que parte delas seja destinada para a regeneração do substrato da GS, enquanto que a outra é utilizada na geração dos outros aminoácidos a partir da ação de aminotransferases. Estas últimas transferem a amida do grupo amino do Glu a uma ampla variedade de 2-oxoácidos (FORDE & LEA, 2007) (**Figura II.3**). Adicionalmente, o grupo amino pode ser transferido de volta quando o 2-oxoglutarato e outros aminoácidos estão disponíveis. Acredita-se que a reversibilidade das aminotransferases permite que o *pool* de Glu se mantenha relativamente estável (FORDE & LEA, 2007).

1.3. *Vriesea gigantea* e o metabolismo do N

Vriesea gigantea Gaudichaud é considerada uma bromélia epífita com tanque. Esse tipo de bromélia caracteriza-se principalmente pela formação de uma estrutura constituída pelo imbricamento das folhas, denominada de tanque, que permite o acúmulo de água e material orgânico que caem sobre a planta. Desta maneira, é possível a absorção de nutrientes através dos tricomas presentes nas bases foliares, os quais ficam em contato com a solução ali acumulada (TOMLINSON, 1969; BENZING *et al.*, 1976; BENZING, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 2007). As bromélias com tanque atuam como um núcleo de suporte para organismos: como anfíbios, outras plantas vasculares, invertebrados e microorganismos (BENZING, 2000; ROMERO *et al.*, 2006, 2008, 2010). Os anfíbios que vivem ou freqüentam o tanque liberam nele seus excretas (ROMERO *et al.*, 2010), os quais constituem um importante recurso de nitrogênio orgânico (ureia) para essas plantas (BENZING, 1990; LOPEZ *et al.*, 1999).

Além disso, em bromélias tanque, a folha é o seu principal órgão vegetativo (BENZING, 2000), executando quase totalmente as funções tanto de absorção de água quanto de absorção/assimilação de nutrientes. Mais ainda, foi proposta a existência de diferenças funcionais, anatômicas e fisiológicas ao longo da folha de bromélias. Dessa maneira, foi visto para o abacaxizeiro (*Ananas comosus*), um gradiente na concentração de nitrogênio ao longo da folha, sendo menor na parte basal do que na parte apical (MEDINA *et al.*, 1994). Além disso, estudos feitos por POPP *et al.* (2003) demonstraram a existência de um gradiente de

concentração de ácidos orgânicos que aumentou da base para o ápice da folha das espécies *Bromelia humilis*, *Aechmea fendler*, *Tillandsia flexuosa* e *Ananas comosus*, havendo, nesta última espécie também um gradiente de acúmulo de carboidratos. Há ainda evidências de que a porção apical das folhas da bromélia *Vriesea sanguinolenta* é a principal região responsável pela atividade fotossintética, quando comparada com a base foliar (ZOTZ *et al.*, 2002). Adicionalmente, foi constatado que os tricomas do ápice foliar são pouco numerosos, comparativamente, àqueles da base (SAKAI & SANDFORD, 1980; TAKAHASHI *et al.*, 2007).

Essa distribuição de tricomas também foi encontrada em *V. gigantea*, em um estudo feito no nosso laboratório por TAKAHASHI *et al.* (2007). Nessa mesma pesquisa, constatou-se que a enzima de assimilação de nitrogênio glutamina sintetase (GS) apresentou atividades significativamente maiores nos ápices foliares quando fornecida ureia no tanque. Mais recentemente, foi comparada também a atividade da urease nas duas porções da folha de planta adultas, mostrando uma maior atividade na base (TAKAHASHI & MERCIER, 2011). Os trabalhos anteriormente mencionados sugerem a existência de uma divisão espacial de funções dentro de uma mesma folha: enquanto a base está associada principalmente à absorção de nutrientes e água, o ápice assumiria o papel fotossintético e de assimilação de nitrogênio.

Como comentado anteriormente (introdução geral e capítulo I), plantas adultas de *V. gigantea* tratadas com ureia possuem uma alta capacidade em transportar ureia e crescer nessa fonte nitrogenada. INSELSBACHER e colaboradores (2007) observaram a alta eficiência que esta bromélia tem em absorver a ureia, apresentando um perfil que não segue a cinética típica de Michaelis-Menten, isto é, mesmo em altas concentrações (10 mM) a absorção de ureia continuou aumentando (não saturou). Nesse mesmo trabalho, foi sugerido que essa bromélia teria a capacidade de secretar urease no tanque, aumentando o rápido aproveitamento da mesma. Posteriormente, foi demonstrada a localização da urease nas paredes, membranas celulares e no citossol de *V. gigantea* (CAMBUÍ *et al.*, 2009). Além disso, notou-se que o CO₂, outro produto da hidrólise da ureia pela urease, parece ter se acumulado junto aos cloroplastos, indicando a existência de uma função alternativa da urease, ajudando na disponibilização não somente de nitrogênio, mas também de carbono à bromélia (CAMBUÍ *et al.*, 2009, MATIZ *et al.*, 2017).

Além das nítidas diferenças funcionais ao longo da folha, as bromélias epífitas tanque também apresentam diferenças anatômicas, morfológicas e na absorção e assimilação de nutrientes ao longo da ontogenia. Quando juvenis (fase atmosférica), as bromélias epífitas tanque possuem um sistema bem desenvolvido de raízes ao contrário da fase adulta, onde acredita-se que o sistema radicular reduzido tem como principal função a fixação à planta

hospedeira (BENZING & RENFROW, 1974). Entretanto, BENZING (2000) comenta a possibilidade das raízes de bromélias epífitas serem funcionais em termos de absorção se expostas a condições nutricionais favoráveis. Isto sugeriria que durante a ontogênese da bromélia epífita com tanque, existe a transição em termos funcionais da raiz, tendo inicialmente na fase atmosférica a função de absorção e passando, já no estado adulto, para uma de fixação à planta hospedeira. Para o gênero *Vriesea* foi visto que as raízes de plantas atmosféricas são eficientes na absorção de água (REINERT & MEIRELLES, 1993; TAKAHASHI, 2014; VANHOUTTE *et al.*, 2017) e conforme a planta vai crescendo e formando o tanque, os tricomas passam a ser as principais vias de entrada de nutrientes e água (VANHOUTTE *et al.*, 2017). Adicionalmente, estudos feitos no nosso laboratório mostraram comportamentos diferenciais nessas duas fases ontogenéticas (atmosférica e adulta-tanque) para as enzimas que participam do metabolismo do nitrogênio de *V. gigantea* (TAKAHASHI, 2014).

Considerando a alta eficiência de absorção de N que possui *V. gigantea*, o presente trabalho visou aprofundar os conhecimentos já obtidos, priorizando a importância da assimilação do nitrogênio, proveniente da ureia, em uma condição de baixa atividade da urease. Além disso, visou discutir a relevância desta enzima nas diferentes fases ontogenéticas e órgãos vegetativos (folha e raiz).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente capítulo teve como objetivo principal determinar a relevância da urease na assimilação da ureia por meio da análise do perfil de aminoácidos nos diferentes órgãos (raízes, porções apical e basal das folhas) de plantas atmosféricas (estágio juvenil) e adultas-tanque de *V. gigantea* quando mantidas em $[^{13}\text{C}]-[^{15}\text{N}]_2$ -ureia e na presença de um inibidor da urease.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Analisar a inibição da atividade da urease (tanto endógena quanto quando fornecido 5mM de ureia nos diferentes órgãos - raiz, porções basal e apical da folha) de plantas de *V. gigantea* nas fases atmosférica e adulta-tanque quando essas foram submetidas a um inibidor da urease.
- 2) Determinar os teores de ureia e amônio de plantas de *V. gigantea* nas fases atmosférica e adulta-tanque quando submetidas a 5mM de ureia, conjuntamente com um inibidor da urease.
- 3) Analisar o perfil de aminoácidos em plantas atmosféricas (estágio juvenil) e adultas-tanque de *V. gigantea* quando mantidas em $[^{13}\text{C}]-[^{15}\text{N}]_2$ -ureia na presença de um inibidor da urease.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições experimentais

Para os experimentos foram utilizadas plantas atmosféricas de 2,5 anos de idade e adultas-tanque de 7 anos de *V. gigantea* (**Figura II.4**).

Figura II.4: Plantas adultas-tanque (painéis superiores) e atmosféricas (painéis inferiores) de *V. gigantea*. Detalhe da estrutura do tanque (à esquerda), disposição das folhas e sistema radicular (à direita). As barras representam 10 cm e 1 cm em plantas adultas ou atmosféricas, respectivamente.

As plantas foram obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro*. Para tanto, sementes de *V. gigantea* foram esterilizadas em etanol 92% por 5 minutos, em seguida mantidas durante duas horas sob agitação em hipoclorito de sódio a 6%, com 3 gotas de Tween 20 para cada 100 mL do volume total da solução. Após desse período, as sementes foram lavadas com água ultrapura estéril, em câmara de fluxo laminar de ar, até eliminar todo o hipoclorito. Após disso, as sementes foram cultivadas em meio contendo somente ágar (5,5 g.L⁻¹) e sacarose (20 g.L⁻¹), permanecendo por três meses. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para um meio de cultivo, contendo macronutrientes da formulação de Knudson (KNUDSON, 1946), micronutrientes da formulação de Murashige e Skoog (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e carbonato de cálcio (1g.L⁻¹), como agente tamponante do meio de cultura (SALAMA & WAREING, 1979). As plantas permaneceram nesse até completarem cerca de um ano e meio de idade, com renovação de meio a cada 6 meses.

Após atingirem a idade de 1,5 anos, as plantas foram transferidas para um substrato comercial composto por uma mistura, contendo "Tropstrato HT Hortalças" (a base de casca de pinheiro, turfa, vermiculita expandida, enriquecido com macro e micronutrientes), casca de pinheiro em decomposição 4K tipo CH-2 e casca de pinus seca 4K-para cultivo de orquídeas, na proporção 3:3:1, respectivamente. Elas foram mantidas em casa de vegetação até atingirem a idade adequada para a realização dos ensaios. Antes dos experimentos, as plantas (atmosféricas e adultas-tanque) foram transferidas durante 15 dias para câmaras de crescimento sob condições controladas de luz (200 μ mol de fótons m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas), temperatura (25°C $\pm$ 2°C) e umidade relativa (60 $\pm$ 10%). Posteriormente, as plantas foram transferidas e mantidas por uma semana em hidroponia (metade da formulação de macronutrientes de KNUDSON (1946) e micronutrientes da formulação de MURASHIGE & SKOOG (1962)) sem fontes de nitrogênio e suplementada com 0,25 mM de CaSO₄ (para balancear os íons de Ca²⁺ e SO₄²⁻ que deixaram de ser fornecidos ao retirar as fontes nitrogenadas da formulação Knudson). Esse procedimento visou esgotar, pelo menos em parte, suas reservas de nitrogênio

Três dias antes do início do experimento foi adicionado à solução de hidroponia o inibidor da urease (cloranil). O inibidor foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído na solução de hidroponia para uma concentração final de 500 μ M (tratamento). A mesma quantidade de DMSO utilizada no tratamento foi adicionada à solução de hidroponia do controle. Após esses 3 dias, foram oferecidos 5mM de ureia juntamente com 1 μ M NiCl₂·6H₂O (cofator da urease) às plantas controle e às tratadas com o inibidor. Para as análises, foram coletadas as

raízes e folhas (parte apical e basal da folha) após 0, 7 e 24 horas após a adição da ureia (**Figura II.5**).

A

Figura II.5: Esquema das condições experimentais. A) Plantas atmosféricas (B, C) e adultas-tanque(D) de *V. gigantea* permaneceram durante 1 semana em condição de hidroponia antes do início dos tratamentos. As linhas tracejadas indicam os tempos de coleta (0, 7 e 14 horas) após o fornecimento de 5mM de ureia. As setas pretas indicam os momentos nos quais as plantas foram expostas ao inibidor da urease (tratamento) e à ureia.

3.2. Inibição da atividade da urease por cloranil e seus efeitos no metabolismo de nitrogênio relacionado à ureia

Atividade da urease

Após as plantas serem expostas primeiramente à solução do inibidor e depois a 5mM de ureia, cada porção foliar (base e ápice) e a raiz foram cortados em pequenos fragmentos, formando uma amostra composta. Previamente, as folhas e raízes foram lavadas com água destilada e secas superficialmente. As medidas de atividade da urease foram realizadas de acordo com o método *in vivo* descrito por HOGAN *et al.* (1983) e TAKAHASHI & MERCIER (2011).

As folhas e raízes cortadas e homogeneizadas foram separadas em alíquotas de 500 mg e 250 mg de matéria fresca, respectivamente, realizando triplicatas para todas as amostras. Posteriormente, os fragmentos vegetais foram colocados dentro de tubos de ensaio, contendo 2 mL de tampão de incubação, previamente desaerado, constituído de fosfato de potássio 100 mM

(pH 7,5), 5% de n-propanol e 200 mM de ureia. Os tubos contendo os fragmentos foram submetidos a vácuo por 3 vezes de 1 minuto cada, para facilitar a infiltração da solução tampão nos tecidos. Em seguida, foram coletadas alíquotas de 100 µL para a determinação da quantidade inicial de amônio presente nos tecidos. O restante foi incubado em banho-maria a 30°C durante 60 minutos. Terminado o tempo de reação, foi coletada uma alíquota de 100 µL para a determinação da quantidade inicial de amônio produzido pela urease nesse intervalo de tempo. O amônio foi quantificado de acordo com o método descrito por McCULLOUGH (1967) e padronizado para os tecidos de bromélias por TAKAHASHI & MERCIER (2011).

Aos 100 µL das amostras foram adicionados 500 µL do reagente A (solução aquosa constituída de 10 g.L⁻¹ de fenol e 50 mg.L⁻¹ de nitroprussiato de sódio) e 500 µL do reagente B (solução aquosa constituída de 5 g.L⁻¹ de hidróxido de sódio, 20 mL.L⁻¹ de hipoclorito de sódio a 5% e 20 mL de fosfato de sódio dibásico a 150 mM). As amostras foram então agitadas e incubadas a 37°C por 35 minutos, sendo em seguida lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm.

a) Quantificação de ureia nos tecidos de *V. gigantea*

Neste estudo foi proposto, inicialmente, quantificar a ureia endógena dos diferentes órgãos de *V. gigantea*, nos mesmos pontos de coleta onde foi analisada a atividade da urease. Entretanto, a quantificação da ureia endógena é baseada no método de dosagem enzimática descrito por GERENDÁS & SATTELMACHER (1997). Nesse método, a ureia endógena é hidrolisada pela enzima urease de *Canavalia ensiformis*, sendo que o amônio formado é quantificado colorimetricamente e lido em espectrofotômetro. Uma vez que as plantas de *V. gigantea* foram tratadas com cloranil (inibidor da urease) não foi possível utilizar esta metodologia para a quantificação de ureia, já que o cloranil presente no tecido inibiria a urease no ensaio. Para tanto, foi desenvolvido um novo método para a quantificação de ureia por meio de GC-MS.

As diferentes porções da folha e raízes foram cortadas em pequenos fragmentos formando uma mistura homogênea. Amostras de 100 mg de massa fresca foram maceradas com nitrogênio líquido e, posteriormente, transferidas para tubos nos quais foram acrescentados 500 µL de uma mistura de metanol, clorofórmio e água na proporção 12:5:1 (v/v/v), juntamente com 40 µL mL⁻¹ de ¹⁸O-urea como padrão interno. Após 30 minutos a 60°C, foram acrescentados 500 µL de água ultra-purificada. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 16.000 g, 4°C por 10 minutos e a fase aquosa foi coletada. Alíquotas de 100 µL da fase aquosa foram secas em speed-vac. Em seguida, 25 µL de piridina e 25 µL de MTBSTFA foram adicionados para a

derivatização da amostra por 1 hora a 92°C. Alíquotas de 1 µL (modo splitless) foram injetadas em um GC-MS quadrupolo equipado com uma coluna Agilent DB-5MS com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e partículas com 0,25 µm de tamanho. Como gás de arraste, utilizou-se um fluxo de 24 mL/min de hélio. A rampa de temperatura foi de 100 °C a 300 °C numa taxa de 6°C/min e a temperatura final foi mantida por mais 10 min. Para a quantificação da ureia endógena foram monitorados os íons 231 e 147, para a ¹⁸O-ureia, os íons 233 e 149.

b) Quantificação de proteínas solúveis totais

Para as quantificações de proteína solúvel total, foram coletados em triplicata 10 mg de material liofilizado de folhas e raízes para cada ponto de coleta. O material foi macerado em nitrogênio líquido, ressuspendido e homogeneizado em 1 mL de água destilada. Em seguida, o extrato foi centrifugado por 20 min a 16000 g a 4°C e coletado o sobrenadante. Deste último, quadruplicadas de 50 µL foram coletadas e colocadas em cada poço de uma microplaca de leitura. Posteriormente, foram adicionados, em cada poço, 250 µL de reagente Bradford-Sigma (diluído 4:1). A leitura foi realizada a 595 nm. Na mesma placa de leitura das amostras foi feita a leitura da curva padrão constituída por diferentes concentrações de BSA.

c) Análise do perfil de aminoácidos por QTOF LC-MS

A análise do perfil de aminoácidos por QTOF LC-MS foi feita sob orientação do Dr. Torgny Näsholm e a Dra. Sandra Jämtgård no Department of Forest Genetics and Plant Physiology na SLU na Suécia.

Depois do período de aclimação e transferência para o sistema hidropônico (uma semana), foram fornecidos 5mM de 100% [¹³C]-[¹⁵N]₂-ureia marcada (99 atom % ¹³C, 98 atom % ¹⁵N) às plantas nas raízes e bases foliares (ver item 3.1 deste capítulo). Para as análises, sete plantas atmosféricas e quatro adultas-tanque foram coletadas em cada ponto de coleta. O perfil de aminoácidos das plantas foi analisado antes da aplicação de ureia (tempo 0) para determinar se houve aumento no pool aminoácidos e/ou enriquecimento na sua marcação.

Extração e derivatização de aminoácidos

A extração de aminoácidos foi realizada de acordo com GULLBERG *et al.*, 2004. Após a colheita, as plantas foram imersas consecutivamente em duas soluções de CaCl₂ a 0,5 mM para remover o excesso de compostos marcados (adsorvidos na superfície das folhas e raízes) e

lavadas com água destilada. Em seguida, as amostras foram congeladas em N líquido, liofilizadas e trituradas em nitrogênio líquido. Posteriormente, a 1 mg de material seco de folha ou 10 mg de raiz foram adicionados 1 mL da mistura de clorofórmio, metanol e água (1: 3: 1, v: v: v), contendo norvalina (0,25 pmol/ μ L) como padrão interno. As amostras foram agitadas a uma frequência de 30 Hz, durante 3 minutos em um moinho de vibração MM 301 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Alemanha) e em seguida centrifugadas a 14000 rpm, a 4° C durante 10 minutos. 200 μ L do sobrenadante foram transferidos para um vial de vidro e secos em Speed-Vac. Os extratos secos (amostras e padrões) foram re-suspensos em 20 μ L de HCl (20 mM), 60 μ L do tampão borato AccQ•Tag™ Ultra e 20 μ L do reagente de derivatização AccQ•Tag™. A mistura foi imediatamente agitada em vórtex durante 10 segundos e, subsequentemente, aquecida a 55°C durante 10 min. O volume total das amostras derivatizadas foi de 100 μ L.

Análise de aminoácidos e amônio

As amostras derivatizadas foram analisadas em um Agilent 6540 UHD Accurate Mass QTOF LC/MS usando uma sonda de ionização por electrospray (Dual AJS ESI) no modo positivo como descrito em CZABAN *et al.* (2016). Os aminoácidos e NH_4^+ foram determinados após separação em coluna Kinetex C18 (100 mm x 2,1 milímetros, com 1,7 μm - tamanho da partícula e 100 Å -tamanho do poro) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA), realizada a 55° C, por cromatografia líquida de fase reversa em um sistema LC HP 1200 da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha). Os tampões para o gradiente de eluição foram o A (H_2O , 0,1% ácido fórmico) e o B (acetonitrila, 0,1% ácido fórmico) e a taxa de fluxo foi 500 $\mu\text{L min}^{-1}$. A condição inicial foi 0,1% B, de 0,54 a 5,5 minutos e a proporção de B aumentou linearmente de 0,1 a 9,1%. Posteriormente, B foi incrementado linearmente de 5,5 minutos para 7,7 minutos até atingir 21,2% a 7,7 minutos. Em seguida, B foi rapidamente aumentado para 60% aos 7,7 minutos e mantido por 1 minuto. Depois desse período, B foi incrementado para 80% aos 8,5 minutos e mantido por 1 minuto com o intuito de eluir os compostos altamente não-polares. Entre os 10 a 10,5 minutos a coluna foi retornada a suas condições iniciais (0,1% B) e equilibrada por 5 minutos antes da injeção da próxima amostra. O tempo total de corrida foi de 15 minutos por amostra. O LC-QTOF foi corrido em *full scan* com a massa de referencia 922.0098 para precisão analítica.

O método de aquisição dos dados foi baseada na proposta por ARMENTA *et al.* (2010) e JOHANSSON *et al.* (manuscrito em preparação). Os aminoácidos de interesse (Arg, Gln, Glu, GABA, Ala, Asp, Ser, Gly e Orn), assim como seus respectivos isotopólogos (molécula que difere unicamente na sua composição isotópica) foram quantificados usando o software *Agilent Mass Hunter Workstation B.07*.

A concentração dos isotopólogos dos aminoácidos nos extratos das plantas foi calculada a partir da porcentagem da soma de todos os isotopólogos de cada aminoácido na amostra. A concentração de cada aminoácido foi calculada a partir de uma curva de calibração com base na área do pico da soma de todos os isotopólogos nos padrões, para cada aminoácido individual. Todas as áreas dos picos foram normalizadas pelo padrão interno, norvalina, presente nas amostras e padrões na mesma concentração. Os dados foram expressos como a média ($\pm$ DP) de sete (plantas atmosféricas) ou quatro (plantas adultas-tanque) réplicas. A concentração total de aminoácidos foi expressa como a média ($\pm$ DP) da soma das concentrações de aminoácidos para cada porção da folha e raiz.

4. RESULTADOS

4.1. Inibição da atividade da urease em plantas de *V. gigantea*

Plantas atmosféricas (2,5 anos) e adultas-tanque (7 anos) foram expostas a 500 μM de cloranil (inibidor da urease) durante três dias e depois analisada a atividade urease nos diferentes órgãos vegetais após 0, 7 ou 24 horas de adicionado 5 mM de ureia.

De maneira geral, a atividade da urease em todos os órgãos vegetais para ambos os estágios ontogenéticos (atmosférica e adulta-tanque) foi inibida significativamente pelo cloranil (**Figura II.6**). Nas folhas de plantas atmosféricas a inibição da atividade endógena da urease (0 horas) foi entorno de 83% e após a aplicação da ureia (7 e 24 horas) a inibição se manteve por volta de 96% (**Figura II.6A**). A inibição da atividade da urease nas raízes, antes (0 horas) e depois de aplicada a ureia, foi de 45,9% e 47% respectivamente (**Figura II.6B**). As atividades de urease para a porção basal e raiz das plantas adultas-tanque também foram significativamente mais baixas em resposta ao cloranil (70,1% e 64,8%, respectivamente- tempo 0), mesmo na presença de ureia (79% e 75%, respectivamente-T24h) (**Figura II.6D**). Entretanto, não foi possível inibir a atividade da porção apical de plantas adultas-tanque (**Figura II.6C**).

Figura II.6: Atividade da urease das porções foliares apical e basal e raiz de plantas atmosféricas (A e B) e plantas adultas-tanque (C e D), quando tratadas com 500 μM de cloranil (inibidor de urease) durante 3

dias e expostas conjuntamente a 5 mM de ureia por 0, 7 e 24 horas. As plantas controle não foram tratadas com o inibidor. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e o tratamento segundo teste T-Student ($p < 0,05$).

Mesmo que a inibição na porção apical de plantas adultas-tanque não tenha sido efetiva, encontrou-se uma alta inibição na região basal da folha e na raiz, locais onde a ureia seria principalmente absorvida e hidrolisada. Adicionalmente, o cloranil inibiu consideravelmente a atividade da raiz de plantas atmosféricas (**Figura II.6B**), órgão que registra as máximas atividades de urease quando comparadas com as dos outros órgãos vegetais e/ou com as atividades registradas em plantas adultas-tanque.

4.2. Teor endógeno de ureia de plantas atmosféricas e adultas-tanque de *V. gigantea* tratadas com o inibidor da urease (cloranil)

O teor de ureia endógeno das plantas na fase atmosférica e adulta-tanque foi quantificado nos mesmos pontos de análise da atividade da urease quando fornecidos 5 mM de ureia. Após a aplicação da ureia, as plantas atmosféricas aumentaram gradativamente o conteúdo endógeno desse composto, sendo essa tendência mais evidente nas plantas tratadas com o inibidor (**Figura II.7A**).

Entretanto, este comportamento não foi observado nas plantas adultas-tanque tratadas com cloranil (**Figura II-7B**), nas quais somente foram observados teores endógenos de ureia significativamente mais elevados na raiz após 7 e 24 horas a partir da aplicação da ureia. Além disso, os resultados também indicam que as plantas atmosféricas tendem a acumular mais ureia do que as plantas adultas-tanque tanto na situação controle quanto na tratada.

Figura II.7: Teor endógeno de ureia em plantas de *V. gigantea* nas fases atmosférica (A) ou adulta-tanque (B) quando fornecidos 500 μ M do inibidor cloranil. O teor de ureia foi analisado nas porções apical e basal da folha e raízes após 0, 7 e 24 horas de ter fornecido 5mM de ureia. As plantas controle não foram tratadas com o inibidor. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e o tratamento segundo teste T-Student ($p < 0,05$).

4.3. Análises do teor de amônio, proteína solúvel e do perfil de aminoácidos de plantas atmosféricas e adultas-tanque de *V. gigantea* tratadas com o inibidor da urease (cloranil)

O perfil total de aminoácidos mostrou um incremento significativo ($p < 0,05$, Tukey-Kramer HSD) só após 24 horas do fornecimento da ureia tanto em plantas atmosféricas quanto em adultas-tanque (controle e inibidas) (**Figura II.8**). Entretanto, este aumento foi significativamente menor nas plantas atmosféricas tratadas com o inibidor da urease (**Figura II.8A**), ao passo que o teor total de aminoácidos em plantas adultas-tanque tratadas com o inibidor de urease após 24 horas de fornecida a ureia não apresentou diferenças quando comparado ao de plantas controle (**Figura II.8B**).

Assim, ao se comparar o teor de aminoácidos do ápice, base e raízes de plantas atmosféricas controle com as de plantas tratadas com o inibidor, a percentagem de redução do teor de aminoácidos aumentou ao longo do tempo. Dessa maneira, no ápice a porcentagem de

redução passou de 37,5% para 62,2% (após 7 a 24 h após o fornecimento de uréia, respectivamente); na parte basal das folhas passou de 23,8% para 40,1% e nas raízes este valor atingiu até 84% de redução, destacando a importância da urease para o metabolismo da ureia neste estágio ontogenético. De modo interessante, a redução no *pool* total de aminoácidos em plantas tratadas com o inibidor foi principalmente devida a uma redução no *pool* total de Gln (Figura II.10), ao invés de uma diminuição no *pool* de outros aminoácidos (Anexos 4 e 5).

Figura II.8: Concentração total de aminoácidos (A, B) e proteína solúvel (C, D) em folhas (porções apical e basal) e raízes de plantas atmosféricas (A, C) e adultas-tanque (B, D) de *V. gigantea* tratadas com o inibidor da urease (barras brancas) depois de 0, 7 e 24 horas do fornecimento de 5mM de [¹³C]-[¹⁵N]₂-uréia. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e o tratamento segundo teste T-Student (p<0,05).

Adicionalmente foi possível observar que a quantidade total de aminoácidos após o fornecimento de ureia em plantas controle e tratadas com o inibidor foi formada principalmente por Gln, GABA, Glu, Ala, Asp e Ser, sendo estes principalmente acumulados na parte apical e basal das folhas de plantas atmosféricas (Figura II.8B e Anexos 4A,B e 5), enquanto que em plantas adultas a base da folha é o principal local de acúmulo (Figura II.8B e Anexos 4C,D e 5). Além disso, as plantas atmosféricas mostraram maior capacidade de aumentar o *pool* de aminoácidos em resposta ao suprimento de ureia quando comparadas às plantas adultas-tanque.

Dado que o aumento no teor de aminoácidos livres apenas foi observado após 24 horas da aplicação da ureia, o conteúdo de proteínas foi quantificado para o mesmo período (**Figuras II.8C e II.8D**). Os dados mostraram que as plantas tratadas com inibidor já tinham teores de proteína mais altos do que o controle antes da aplicação de ureia (tempo 0), provavelmente associado a alguma resposta pela aplicação do inibidor. Entretanto, após a aplicação da ureia, as plantas atmosféricas tratadas com o inibidor diminuíram o teor de proteínas (T0 para T24), enquanto que as controle aumentaram o conteúdo principalmente na base e ápice (**Figura II.8C**). Por sua vez, as plantas adultas-tanque tratadas com o inibidor também diminuíram o conteúdo de proteína principalmente na porção apical (**Figura II.8D**).

Mesmo que o teor de amônio tenha aumentado ao longo do tempo após o fornecimento de ureia, tanto em plantas atmosféricas quanto adultas-tanque (controle e tratadas com o inibidor), ficou evidente que o inibidor da urease causou uma queda nos níveis endógenos de amônio, por conta da diminuição da atividade da urease. Essa ideia é reforçada ao se levar em conta a diminuição significativa no conteúdo do isotópico+1 do amônio (o qual representa o amônio proveniente da ureia marcada) quando comparado às plantas controle (**Figuras II.9C e F**). Além disso, o *pool* de amônio monoisotópico (+0) permaneceu estável ao longo do tempo (**Figuras II.9B e E**), indicando que o aumento no *pool* total de amônio foi devido à hidrólise de ureia ao invés de outras fontes de amônio.

Figura II.9: Concentração total de amônio (A, D), amônio monoisotópico (+0) (B, E) e o isotópologo +1 do amônio (C, F) em folhas (porções apical e basal) e raízes de plantas atmosféricas (A-C) e adultas-tanque (D-F) de *V. gigantea* tratadas com o inibidor da urease (barras brancas) depois de 0, 7 e 24 horas do fornecimento de 5mM de ^{13}C - ^{15}N ₂-ureia. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e o tratamento segundo teste T-Student ($p < 0,05$).

Conseqüentemente, as quantidades de Gln (e seus isotópologos) foram significativamente mais baixas em plantas atmosféricas tratadas com o inibidor da urease após o fornecimento de ureia (**Figura II.10**), uma vez que este é o primeiro aminoácido produzido com a assimilação do amônio. Entretanto, isto não foi observado nas plantas adultas-tanque tratadas com o inibidor (**Figura II.11**), mesmo apresentando uma redução significativa na atividade da urease e no teor de amônio.

Figura II.10: Concentração total de glutamina (A) e dos seus diferentes isotopólogos (B) em folhas (porções apical e basal) e raízes de plantas atmosféricas de *V. gigantea* tratadas com o inibidor da urease (barras brancas) depois de 0, 7 e 24 horas do fornecimento de 5mM de $[^{13}\text{C}]-[^{15}\text{N}]_2$ -ureia. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e o tratamento segundo teste T-Student ($p < 0,05$).

Figura II.11: Concentração total de glutamina (A) e dos seus diferentes isotopólogos (B) em folhas (porções apical e basal) e raízes de plantas adultas-tanque de *V. gigantea* tratadas com o inibidor da urease (barras brancas) depois de 0, 7 e 24 horas do fornecimento de 5mM de $[^{13}\text{C}]-[^{15}\text{N}]_2$ -ureia. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e o tratamento segundo teste T-Student ($p < 0,05$).

Dado que Gln é formado a partir da incorporação de uma molécula de amônio no ácido glutâmico (Glu), pensava-se que a redução do *pool* de Gln nas plantas atmosféricas poderia também ser devida a uma redução no pool de Glu. No entanto, as quantidades de Glu mostraram pouca variação entre controle e tratamento após 24 horas do fornecimento da ureia (**Figuras II.12A**), indicando que a redução na concentração de Gln nas plantas atmosféricas tenha ocorrido por causa da ausência de amônio ao invés de Glu. De igual maneira, as plantas adultas-tanque também não apresentaram diferenças significativas nos teores totais de Glu após 24 horas da adição da ureia (**Figura II-13A**).

Além disso, após a adição da ureia, a proporção dos isotopólogos da Gln e Glu ao longo do tempo não mostrou diferenças significativas entre plantas controle e tratadas com o inibidor da urease, (**Figuras II.14 e II.15**), indicando que a mesma via de assimilação de ureia foi utilizada em plantas atmosféricas e adultas-tanque controle e inibidas.

Figura II.12: Concentração total de glutamato (A) e dos seus diferentes isotopólogos (B) em folhas (porções apical e basal) e raízes de plantas atmosféricas de *V. gigantea* tratadas com o inibidor da urease (barras brancas) depois de 0, 7 e 24 horas do fornecimento de 5mM de $[^{13}\text{C}]-[^{15}\text{N}]_2$ -ureia. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e o tratamento segundo teste T-Student ($p < 0,05$).

Figura II.13: Concentração total de glutamato (A) e dos seus diferentes isotopólogos (B) em folhas (porções apical e basal) e raízes de plantas adultas-tanque de *V. gigantea* tratadas com o inibidor da urease (barras brancas) depois de 0, 7 e 24 horas do fornecimento de 5mM de $[^{13}\text{C}]-[^{15}\text{N}]_2$ -ureia. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e o tratamento segundo teste T-Student ($p < 0,05$).

Figura II.14: Proporção de cada isotópologo de glutamina em folhas (porções apical e basal) e raízes de plantas atmosféricas (A) e adultas-tanque (B) de *V. gigantea* tratadas com o inibidor da urease (barras brancas) depois de 0, 7 e 24 horas do fornecimento de 5mM de $[^{13}\text{C}]-[^{15}\text{N}]_2$ -ureia. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e o tratamento segundo teste T-Student ($p < 0,05$).

Dos demais aminoácidos, os teores de ácido aspártico (Asp), alanina (Ala), serina (Ser) e ácido gama-aminobutírico (GABA) foram mais abundantes 7 e 24 h após o fornecimento de ureia em plantas atmosféricas e adultas de *V. gigantea* (**Anexo 5**). Entretanto, poucas diferenças entre tratamento e controle foram observadas após 24 horas da adição de ureia em plantas atmosféricas (**Anexo 5A**). Já em plantas adultas-tanque foram observadas diminuições consideráveis nos teores de GABA (ápice e base da folha) e Ala (base) após o fornecimento da ureia em plantas tratadas com o inibidor da urease.

4.4. Assimilação direta de ureia em plantas de *V. gigantea*

Em um cenário em que a hidrólise de ureia é insuficiente (devido a uma baixa atividade de urease), ela poderia ser hipoteticamente assimilada diretamente em compostos orgânicos. Uma vez que em plantas adultas-tanque não foi observado uma diminuição significativa no pool total de aminoácidos (incluindo Gln e Glu), pensou-se que uma via alternativa de assimilação de ureia poderia estar acontecendo. Assim, possivelmente, a ureia poderia ser assimilada diretamente na arginina, o ácido 3-guanidino-propiónico, a agmatina e/ou a glicociamina, resultante da reação da ureia com a ornitina, a β -alanina, a putrescina e a glicina, respectivamente. No entanto, não foi possível analisar e quantificar o ácido 3-guanidino propiónico, a agmatina e a glicociamina devido à falta de padrões marcados e informações sobre o tipo adequado de método de LC-MS e o derivatizante a ser usado para a análise. Também não foi possível analisar as possíveis mudanças nos teores de ornitina e glicina que poderiam dar alguma informação sobre a formação potencial de arginina e glicociamina, respectivamente, uma vez que as concentrações destes aminoácidos ficaram muito próximas ao limite de detecção do método. Portanto, a arginina (e seus isotópicos) foi o principal candidato para analisar o processo de assimilação direta da ureia (**Figura II.16**).

O *pool* total de arginina (Arg) não mostrou um enriquecimento ao longo do tempo e apresentou teores muito baixos quando comparados com os teores de outros aminoácidos nos tecidos foliares (ápice e base) e raízes de plantas atmosféricas e adultas (**Figura II.16**). Uma vez que foram aplicados 5 mM de $[^{13}\text{C}]-[^{15}\text{N}]_2$ -ureia (ureia+3) às plantas, seria de se esperar um aumento no teor do isotópico+3 da arginina (devido à assimilação direta da ureia na arginina). No entanto, não foram detectadas diferenças significativas no conteúdo de arginina, em resposta à inibição da urease juntamente com o fornecimento de ureia. Apesar de um aumento significativo após 24 horas da aplicação de ureia no *pool* total de arginina na porção apical das folhas pertencentes às plantas tanque tratadas com o inibidor da urease (**Figura II.14B**), este aumento não foi detectado no isotópico+3. Dessa maneira, o processo de

assimilação direta da ureia em plantas de *V. gigantea* (sem prévia hidrólise da uréia) parece improvável de ocorrer, pelo menos, através da incorporação da ureia na arginina.

Figura II.17: Concentração total de arginina e dos seus diferentes isotopólogos em folhas (porções apical e basal) e raízes de plantas atmosféricas (A) e plantas-tanque (B) de *V. gigantea* tratadas com o inibidor da urease (barras brancas) depois de 0, 7 e 24 horas do fornecimento de 5mM de $[^{13}\text{C}]-[^{15}\text{N}]_2$ -ureia. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e o tratamento segundo teste T-Student ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

As bromélias epífitas, como *Vriesea gigantea*, estão submetidas à disponibilidade intermitente ou sazonal de água e nutrientes, sendo compostos orgânicos, como a ureia, importantes fontes de nitrogênio para essas plantas. Estudos anteriores feitos no nosso laboratório mostraram que *V. gigantea* cresce melhor em ureia do que em fontes inorgânicas, como o amônio (ENDRES & MERCIER, 2001). Adicionalmente, essa mesma bromélia mostrou ter uma alta capacidade de absorver ureia quando presente em altas concentrações (INSELSBACHER *et al.* 2007). Dessa maneira, é de grande importância conhecer os mecanismos envolvidos tanto na absorção quanto na assimilação da ureia, numa planta que demonstra ter uma grande afinidade por esta fonte nitrogenada. Também é de grande importância conhecer se estes processos são afetados ao longo da ontogenia da planta, uma vez que esta espécie apresenta mudanças morfológicas conspícuas.

Assim, para poder conhecer a relevância da urease no processo de assimilação de ureia em *V. gigantea*, as plantas na fase atmosférica e adulta-tanque foram expostas ao cloranil (um inibidor da urease). As quinonas são compostos altamente presentes na natureza, atuando como agentes biológicos nos processos de óxido-redução. Curiosamente, observou-se que as quinonas têm uma ação inibitória sobre as enzimas ureolíticas. Hoje em dia, sabe-se que a 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranil) forma um complexo muito estável com a urease, sendo capaz de se ligar às cisteínas na região da aba da urease, causando assim, a inibição irreversível da urease (KOT & ZABORSKA, 2006; ZABORSKA *et al.*, 2007). A atividade da urease em plantas atmosféricas e adultas-tanque foi significativamente diminuída (nos órgãos com considerável atividade ureolítica) pelo cloranil em todos os pontos amostrados, mesmo depois de aplicada a ureia às plantas (**Figura II.6**). Do mesmo modo, estudos feitos com NBPT, um inibidor aplicado em solos para diminuir a volatilização do N da ureia (através da inibição da atividade ureolítica dos microorganismos), demonstraram ter um efeito negativo sobre a atividade ureolítica em plantas de milho (ZANIN *et al.*, 2015, 2016).

CAO e colaboradores (2010) sugeriram que a atividade ureolítica em plantas é suficientemente alta para metabolizar grandes quantidades de ureia, sendo desnecessário o aumento da atividade da urease. Entretanto, TAKAHASHI & MERCIER (2011) reportaram incrementos significativos da atividade da urease na base das folhas de plantas adultas-tanque tratadas com ureia, assim como, na raiz de plantas atmosféricas (TAKAHASHI, 2014). Por sua vez, ZANIN e colaboradores (2016) também registraram aumentos na atividade da urease de raízes e da parte aérea de plantas de milho após 24 h da adição da ureia. Esses incrementos de

atividade também foram observados neste trabalho, sendo possível registrar um aumento na atividade da urease em raízes tanto de plantas adultas-tanque quanto de atmosféricas após 24h da aplicação da ureia. Este incremento também foi observado na porção basal das folhas de plantas adultas-tanque (**Figura II.6**).

O fato de *V. gigantea* apresentar atividades de urease elevadas e induzíveis pela ureia poderia ser consequência da elevada preferência que possui por essa fonte nitrogenada. INSELSBACHER *et al.* (2007) observaram a alta eficiência que tem esta bromélia em absorver a ureia. Nesse mesmo trabalho, hipotetizou-se que *V. gigantea* teria a capacidade de secretar ureases para o meio externo (por exemplo, interior do tanque) para o rápido aproveitamento desse composto. Esse poderia ser um mecanismo que, aliado à expressão constitutiva da urease, permitiria a essa bromélia utilizar rapidamente a ureia quando estivesse disponível. Adicionalmente, é possível que a presença de microrganismos (endofíticos e epifíticos) na folha e na raiz de *V. gigantea* possam contribuir com as atividades de urease encontradas. Entretanto, não há trabalhos que demonstrem o quanto esses microrganismos contribuem para a atividade da urease registrada em plantas.

Apesar das altas atividades de urease na raiz de plantas atmosféricas, e na raiz e base de plantas adultas-tanque, foi visto um aumento no conteúdo de ureia em todos os órgãos após a aplicação de ureia. De maneira interessante, apenas em plantas atmosféricas tratadas com o inibidor esse acúmulo foi significativamente maior quando comparado com plantas controle (tempo 24 horas). Estes resultados sugerem que ao ter baixa atividade da urease (tratamento com cloranil), a ureia é armazenada e/ou transportada em direção ao ápice das folhas de plantas atmosféricas (**Figura II.7A**). Vários estudos onde a urease encontrava-se inativa fosse pela ação de um inibidor, deficiência de níquel ou mutações nos genes de proteínas chaperonas (necessárias para a ativação da enzima) mostraram acúmulos significativamente maiores de ureia do que no controle (plantas com urease ativa) (STEBBINS *et al.*, 1991; POLACCO & HOLLAND, 1993; GERENDÁS & SATTELMACHER, 1997; GERENDÁS *et al.*, 1998; ZANIN *et al.*, 2016). Entretanto, isto não foi observado em plantas adultas-tanque tratadas com o inibidor (**Figura II.7B**). Além disso, os resultados também indicam que as plantas atmosféricas tendem a acumular mais ureia do que as plantas adultas-tanque tanto na situação controle quanto na tratada. Esses resultados sugerem que as plantas atmosféricas teriam taxas de absorção da ureia e/ou uma capacidade de armazenamento maior do que as plantas adultas-tanque.

As plantas atmosféricas mostraram maior capacidade de aumentar o *pool* de aminoácidos em resposta ao suprimento de ureia (após 24 h) quando comparadas às plantas

adultas-tanque (**Figura II.8**). Estes resultados sugerem não apenas diferenças entre os órgãos (porções foliares e raiz) em termos de acúmulo de aminoácidos, mas também diferenças entre os estágios ontogenéticos em resposta à disponibilidade de ureia. Adicionalmente, as plantas atmosféricas tratadas com o inibidor apresentaram teores significativamente menores de aminoácidos livres do que as plantas controle, sendo que essa diminuição parece ser devida principalmente à diminuição do conteúdo de Gln (**Figura II.10**). Já as plantas adultas-tanque tratadas com o inibidor não mostraram diferenças no *pool* total de aminoácidos (**Figura II.8**) e nem nos teores de Gln (**Figura II.11**) e Glu (**Figura II.13**).

Claramente os resultados mostraram que a inibição da urease em plantas atmosféricas e adultas-tanque foi eficiente em diminuir a atividade e limitar a produção de amônio, particularmente o isotópulo+1, o qual seria proveniente da ureia (**Figura II.9**). De maneira interessante, nas plantas atmosféricas e, até certo ponto, em plantas adultas-tanque, a atividade de urease foi significativamente alta nas raízes (**Figura II.6**), enquanto que o teor de aminoácidos nesse órgão foi muito baixo (em ambas plantas controle e inibidas) mesmo depois de fornecer ureia às plantas. Isto indica que o amônio produzido pela hidrólise de ureia é transportado para as partes superiores da planta ou o amônio é assimilado em glutamina (Gln), a qual é rapidamente transportada para as partes superiores. Evidências para ambas as suposições são mostradas nas **figuras II.9, II.10 e II.11**, nas quais os conteúdos de amônio (particularmente seu isotópulo+1) e Gln aumentaram muito ao longo do tempo nos tecidos foliares, exceto nas raízes, demonstrando que nem o amônio nem a Gln são acumulados nas raízes. Entretanto, uma vez que as enzimas de assimilação de nitrogênio são reguladas pela luz (LAM *et al.*, 1996) ou por processos ligados à fotossíntese (necessidade de poder redutor) espera-se que as enzimas de assimilação estejam principalmente na folha. De fato, TAKAHASHI & MERCIER (2011) e TAKAHASHI (2014), comprovaram que a atividade da GS localiza-se principalmente na porção apical da folha de plantas atmosféricas e adultas-tanque de *V.gigantea*. Esses resultados, juntamente com os obtidos neste trabalho, sugerem que o amônio produzido na raiz seria transportado para folhas da bromélia. Adicionalmente, seria de se esperar que a folha não possuísse teores elevados de amônio, já que esse composto tem um efeito tóxico para a planta quando em alta concentração (BRITTO & KRONZUCKER, 2002). Mesmo assim, as plantas de *V. gigantea* mostraram ter uma alta capacidade de acúmulo de amônio após o fornecimento de ureia (**Figura II.9**).

Uma vez que os nutrientes no hábitat epifítico encontram-se disponíveis esporadicamente, tem sido observado que as bromélias epífitas possuem o chamado "consumo de luxo", isto é, um processo que consiste na absorção rápida de nutrientes quando disponíveis e

seu estoque para posterior uso em épocas de déficit nutricional (LIN & YEH, 2008; WINKLER & ZOTZ, 2010). Além disso, GONÇALVES e colaboradores (2016) observaram que a subfamília Tillandsioideae de bromélias (especificamente *V. gigantea*) armazena o excesso de N na forma de aminoácidos. Dessa maneira, a alta capacidade das plantas atmosféricas de acumular amônio, ureia e aminoácidos em quantidades superiores às registradas em plantas adultas-tanque, indica que neste estado ontogenético as plantas de *V. gigantea* possuem um evidente consumo de luxo. Possivelmente, a ausência de um tanque no estágio atmosférico impede que estas plantas estejam em contato com os nutrientes por um período mais prolongado (como aconteceria nas plantas adultas-tanque). Possuir essa estratégia para a captação de nutrientes permitiria aumentar as possibilidades de sobrevivência no hábitat epifítico.

As plantas atmosféricas tratadas com o inibidor mostraram uma clara diminuição nos teores de Gln (**Figura II.10**) devido principalmente à redução de amônio e não pela falta de Glu, uma vez que foi visto que os teores de Glu não variaram entre controle e tratamento (**Figura II.12**). Mais ainda, em plantas adultas-tanque os teores de Gln e Glu não variaram entre controle e tratamento, mesmo havendo uma diminuição dos teores de amônio em plantas tratadas com o inibidor (**Figuras II.11 e II.13**). A pouca variação nos níveis de Glu entre estágios ontogenéticos ou em experimentos relacionados com nutrição nitrogenada já foi observada em outros estudos (GEIGER *et al.*, 1998; GEIGER *et al.*, 1999; SCHEIBLE *et al.*, 2000; TERCÉ-LAFORGUE *et al.*, 2004; URBANCZYK-WOCHNIAK *et al.*, 2005), sendo afetado apenas quando enzimas chave são desativadas, como aquelas relacionadas com a produção de 2-oxoglutarato. Aparentemente, o Glu parece ter um papel central em plantas, já que suas concentrações parecem ser controladas homeostaticamente, uma vez que um amplo número de enzimas consegue usar o Glu como substrato ou formá-lo como produto. Dessa maneira, não só a síntese deste aminoácido durante a assimilação do nitrogênio (via GS/GOGAT), mas também na desaminação via GDH ou aminotransferases faz que seu conteúdo endógeno se mantenha estável (MASCLAUX-DAUBRESSE *et al.*, 2006). Assim, o glutamato parece participar na sinalização do N, permitindo à planta monitorar e se adaptar às mudanças no seu estado nutricional (N) e disponibilidade de nitrogênio (LAM *et al.*, 2006). Entretanto, os mecanismos de como o Glu pode ser uma molécula sinal ainda precisam ser mais bem estudados.

De maneira interessante, em plantas adultas-tanque foram observadas diminuições consideráveis nos teores de GABA (ápice e base da folha) e Ala (base) após o fornecimento da ureia em plantas tratadas com o inibidor da urease, sugerindo que o Glu foi utilizado principalmente para manter o ciclo GS/GOGAT (e por tanto os níveis de Gln), ao invés de ser destinado para processos de transaminação (**Anexo 5C**).

Além disso, após a adição da ureia, a proporção dos isotopólogos da Gln e Glu ao longo do tempo não mostrou diferenças significativas entre plantas controle e tratadas com o inibidor da urease, (**Figuras II.14 e II.15**), indicando que a mesma via de assimilação de ureia foi utilizada em plantas atmosféricas e adultas-tanque inibidas pela urease. Mais ainda, observou-se que o isotopólogo+2 da Gln foi o mais abundante no final do tratamento (**Figura II.14**), enquanto que o isotopólogo+1 do Glu foi o mais abundante 7 e 24 horas após o fornecimento da ureia (**Figura II.15**). Isto sugere que um amônio marcado proveniente da ureia foi assimilado em uma molécula do Glu já marcada (Glu+1) via GS, resultando no isotopólogo+2 da Gln. Conseqüentemente, a Gln+2 enriquece o *pool* do Glu+1 através da transferência de um dos seus N marcados ao 2-oxoglutarato via GOGAT (**Figura II. 17**). Assim, estes resultados sugerem que a via principal de assimilação do N da ureia é através do ciclo GS/GOGAT em plantas atmosféricas e adultas-tanque tratadas ou não tratadas com o inibidor da urease.

Figura II.17: Dinâmica da assimilação do amônio proveniente da ureia em plantas de *V. gigantea*. O amônio marcado da ureia é assimilado em moléculas de glutamina (Gln), causando o enriquecimento do isotopólogo+1 do glutamato (Glu+1) e do isotopólogo+2 da glutamina (Gln+2) ao longo do tempo. O nitrogênio marcado é mostrado em vermelho.

Ainda que a assimilação da ureia pareça acontecer principalmente via GS/GOGAT, WALKER (1952) notou que a alga *Chlorella pyrenoidosa* crescida em ureia tinha um alto conteúdo de arginina e não foi possível detectar atividade da urease, hipotetizando que a via de incorporação seguia um ciclo de Krebs-ureia reverso. Essa ideia foi também proposta por THOMAS & KRAUSS (1955), os quais encontraram que a ureia estimulava a produção de arginina na alga verde, *Scenedesmus obliquus*. HATTORI (1958) também reportou ter encontrado arginina como intermediário na assimilação de ureia em *Chlorella ellipsoidea*, e como no estudo de WALKER (1952), foi incapaz de detectar atividade da urease. BAKER & THOMPSON (1962) não conseguiram encontrar atividade ureolítica em *Chlorella vulgaris*, concluindo por seus resultados de perfil de aminoácidos que a incorporação de ureia não envolveu a hidrólise catalisada pela urease. Ainda que todos esses trabalhos sugiram uma via de assimilação direta da ureia, sem prévia hidrólise da mesma, até o momento não foi possível caracterizá-la bioquimicamente nos seres vivos. Devido à não redução do pool de aminoácidos

(principalmente Gln e Glu) ou a um aumento considerável na concentração de ureia em plantas adultas-tanque com baixa atividade da urease (entorno de 25% de atividade remanescente em plantas tratadas com o inibidor), se questionou se um processo de assimilação direta não poderia estar acontecendo nestas plantas.

Dessa maneira, foi analisado se as plantas tratadas com o inibidor da urease aumentavam as concentrações de arginina e, mais especificamente, o isotopólogo+3 (gerado pela incorporação direta da ureia marcada na ornitina) (**Figura II. 16**). Entretanto, o processo de assimilação direta da ureia em plantas de *V. gigantea* na arginina parece bastante improvável, uma vez que não houve um aumento do isotopólogo+3 da arginina nas plantas com baixa atividade da urease (tratamento com o inibidor), nem nos momentos iniciais do fornecimento da ureia (7 horas). Assim, o processo de assimilação de ureia deve seguir principalmente as vias GS/GOGAT para a assimilação do N, sendo necessária a ação prévia da urease.

As **figuras II.18 e II.19**, visam ilustrar as possíveis dinâmicas de assimilação da ureia em plantas de *V. gigantea* atmosféricas e adultas-tanque, respectivamente.

Figura II.18: Esquema das possíveis dinâmicas de assimilação da ureia em plantas atmosféricas de *V. gigantea*. Os dados baseiam-se nos resultados obtidos nesta pesquisa, junto com as informações fornecidas por TAKAHASHI & MERCIER (2011) e TAKAHASHI (2014). Do lado esquerdo da linha tracejada mostram-se os gradientes (ao longo da folha e raízes) das atividades da GS e da urease, assim como, os teores totais de proteína, aminoácidos livres e amônio depois de fornecida a ureia às plantas. Do lado direito da linha tracejada representam-se as dinâmicas de assimilação do nitrogênio proveniente da ureia, baseados nos conteúdos dos isotópicos dos aminoácidos e do amônio. As setas e quadros vermelhos representam os processos onde a inibição da urease causou algum efeito. ① a hidrólise da ureia se dá principalmente na raiz, sendo consideravelmente inibida pelo cloranil (Figura II.6); ② o amônio gerado é transportado da raiz para a parte basal e apical da folha, evitando seu acúmulo na raiz, além disso, devido à baixa atividade da urease (pela ação do inibidor) os teores de amônio na folha são menores dos que os do controle (Figura II.9); e ③ se dá o acúmulo de ureia na base e principalmente no ápice das folhas (Figura II.7); ④ TAKAHASHI (2014) reportou atividades da GS principalmente no ápice das folhas, entretanto, devido à base foliar ser também um pouco clorofilada, acredita-se que parte da assimilação do amônio em Gln possa acontecer também nessa região. Adicionalmente, não se descarta a possibilidade de haver transporte de Gln entre as porções foliares. Pela diminuição dos teores de amônio em plantas tratadas com o inibidor, os teores de glutamina e seus isotópicos mais abundantes (+1 e +2) foram reduzidos (Figura II.10); ⑤ apesar de não se ter informações sobre as atividades da enzima GOGAT em *V. gigantea*, acredita-se que o Glu+1 possa ser formado no ápice e na base a partir da Gln (Gln+1, Gln+2), podendo ser transportado entre as regiões foliares (Figura II.12); ⑥ o Glu+1 é posteriormente transaminado em GABA+1 e outros aminoácidos como Ala+1, Asp+1 e Ser+1 (Anexo 5); ⑦ os níveis de Glu são mantidos pelo ciclo GS/GOGAT e pela ação reversa de algumas transaminases. Devido aos teores dos aminoácidos (exceto a Gln) não terem sido afetados pelo tratamento (inibidor da urease), acredita-se que a diminuição do teor de proteína na base das plantas atmosféricas (Figura II.8C) tenha ajudado a manter os níveis de Glu, ⑧ foi visto que a Asn+1 diminuiu significativamente na base de plantas tratadas com o inibidor (Anexo 6). Provavelmente, devido à degradação de proteína na base, a Asn+1 seja

transportada para o ápice, atuando como substrato das transaminases, uma vez que devido a seu alto conteúdo C:N, a Asn normalmente participa de processos de transporte/remobilização de N. NUN representa a ureia com seus dois nitrogênios marcados.

Figura II.19: Esquema das possíveis dinâmicas de assimilação da ureia em plantas adultas-tanque de *V. gigantea*. Os dados baseiam-se nos resultados obtidos nesta pesquisa, junto com as informações fornecidas por TAKAHASHI & MERCIER (2011) e TAKAHASHI (2014). Do lado esquerdo da linha tracejada mostram-se os gradientes (ao longo da folha e raízes) das atividades da GS e da urease, assim como, os teores totais de proteína, aminoácidos livres, ureia e amônio depois de fornecida a ureia às plantas. Do lado direito da linha tracejada representam-se as dinâmicas de assimilação do nitrogênio proveniente da ureia, baseados nos conteúdos dos isotopólogos dos aminoácidos e do amônio. As setas e quadros vermelhos representam os processos onde a inibição da urease causou algum efeito. ① a hidrólise da ureia se dá na raiz e na porção basal da folha (principais locais com ação ureolítica), sendo consideravelmente inibida pelo cloranil (**Figura II.6**); ② o amônio gerado na raiz é transportado para a parte basal da folha, evitando seu acúmulo na raiz, além disso, devido à baixa atividade da urease (pela ação do inibidor) os teores de amônio na folha são menores dos que do controle na base foliar e na raiz (**Figura II.9**); ③ os teores de ureia aumentam da base para o ápice após a aplicação da ureia, entretanto em plantas tratadas com o inibidor o transporte da ureia da raiz para a base é prejudicado, gerando o seu acúmulo na raiz e diminuindo na base (**Figura II.7B**); ④ TAKAHASHI & MERCIER (2011) reportaram atividades da GS principalmente no ápice das folhas, assim, acredita-se que a maioria do amônio é transportado para o ápice e assimilado em Gln (Gln+1 e Gln+2), ⑤ esta última não se acumularia no ápice, primeiro porque formaria Glu (pela ação da GOGAT) e segundo porque seria transportada rapidamente para a base foliar (**Figura II.11**); ⑥ apesar de não existirem informações sobre as atividades da enzima GOGAT em *V. gigantea*, acredita-se que o Glu+1 é formado no ápice e na base a partir da Gln (Gln+1, Gln+2), ⑦ podendo ser transportado entre as regiões foliares (**Figura II.13**); nas plantas tratadas com o inibidor foi visto que mesmo o *pool* de Glu não variando entre controle e tratamento, ⑧ os isotopólogos

do Glu (Glu+1, Glu+2 e Glu+3) são mais abundantes na porção apical de plantas inibidas, indicando uma maior atividade reversa das transaminases do ápice foliar; ⑨ o Glu+1 é posteriormente transaminado em GABA+1 e outros aminoácidos como Ala+1, Asp+1 e Ser+1 (**Anexo 5**), entretanto em plantas tratadas com o inibidor os níveis de GABA+1, Ala+1 e Ser+1 diminuem consideravelmente, mantendo os níveis de Glu e só uma parte do Glu+1 é transaminado (**Anexo 5**). Adicionalmente, parte dos aminoácidos formados podem ser transaminados de volta para a formação de Glu (como visto em ⑧). Além disso, a diminuição do teor de proteína no ápice (**Figura II.8D**) também pode ajudar a manter os níveis de Glu em plantas inibidas. ⑩ Adicionalmente, a formação de Ala+1 seria principalmente na base (**Anexo 5**), sendo ⑪ posteriormente transportada para o ápice onde é convertida em Asn+1, entretanto, nas plantas inibidas parece que a formação de Ala+1 e seu transporte são comprometidos, resultando em uma diminuição considerável do *pool* de Asn (Asn+1) no ápice (**Anexo 6**).

Baseado nos dados obtidos neste estudo, sugere-se que a urease em plantas atmosféricas tenha grande importância, já que ao inibir a atividade desta entorno de 50% na raiz e quase 100% na folha, foi detectado um grande impacto na assimilação do nitrogênio, particularmente nos primeiras etapas do ciclo GS/GOGAT, causando assim a diminuição considerável de Gln. Aparentemente, os 50% remanescentes de atividade não foram suficientes para manter um metabolismo adequado de forma a não prejudicar o ciclo GS/GOGAT. WITTE e colaboradores (2002) sugeriram que a urease não seria um elemento limitante na assimilação do amônio em plantas de *Solanum tuberosum* com baixa atividade da urease. Contudo, em plantas atmosféricas a urease parece ser de fato um passo limitante para a assimilação do N da ureia, dado que limita a produção de amônio e produção de Gln. Já nas plantas adultas-tanque, 25% da atividade remanescente da urease é mais do que suficiente para lidar metabolicamente com a ureia aplicada. Entretanto, a redução por volta de 75% da atividade da urease causou problemas principalmente na transaminação dos aminoácidos (muito possivelmente visando manter o *pool* de Glu e consequentemente o de Gln via GS/GOGAT).

Estas diferenças entre as fases ontogenéticas respeito à assimilação de ureia podem ser devido às diferenças morfológicas que apresentam. Dessa maneira, as plantas atmosféricas precisariam da rápida assimilação da ureia quando disponível, uma vez que não possuem um tanque para armazenar os nutrientes por mais tempo, precisando metabolizar a ureia muito mais rapidamente. Isto também é evidenciado pelo seu alto consumo de luxo quando comparado ao de plantas adultas-tanque.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMENTA, S.; MOROS, J.; GARRIQUES, S.; DE LA GUARDIA, M. (2010). The use of near-infrared spectrometry in the olive oil industry. *Crit Rev Food Sci.* 50(6): 567-582.
- BALASUBRAMANIAN, A. & PONNURAJ, K. (2010). Crystal structure of the first plant urease from Jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *J. Mol. Biol.* 400: 274-283.
- BAKER, J.E & THOMPSON, J.F. (1962). Metabolism of urea & ornithine cycle intermediates by nitrogen-starved cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* 37(5): 618-624.
- BECKER-RITT, A.B.; MARTINELLI, A.H.S.; MITIDIERI, S.; FEDER, V.; WASSERMANN, G.E.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M.H.; OLIVEIRA, J.T.; FIUZA, L.M.; PASQUALI, G.; CARLINI, C.R. (2007). Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon* 50: 971-983.
- BENZING, D.H & RENFROW, A. (1974). The mineral nutrition of Bromeliaceae. *Bot Gaz.* 135(4): 281-288.
- BENZING, D. H.; HENDERSON, K.; KESSEL, B.; SULAK, J. (1976). The absorptive capacities of bromeliad trichomes. *Am. J. Bot.* 63: 1009- 1014.
- BENZING, D.H. (1990). Vascular epiphytes, general biology and related biota. Ashton P.S. Cambridge, *Cambridge University Press*. UK.
- BENZING, D.H. (2000). Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge, *Cambridge University Press*. UK.
- BOWSHER, C.G.; LACEY, A.E.; HANKE, G.T.; CLARKSON, D.T.; SAKER, L.R.; STULEN, I.; EMES, M.J. (2007). The effect of Glc6P uptake and its subsequent oxidation within pea root plastids on nitrite reduction and glutamate synthesis. *J Exp Bot.* 58: 1109-1118.
- BRITTO, D.T. & KRONZUCKER, H.J. (2002). NH_4^+ toxicity in higher plants: A critical review. *J. Plant Physiol.* 159: 567-584.
- BURNE, R.A. & CHEN, Y.M. (2000). Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes Infect.* 2: 533-542.
- CALLAHAN, B.P.; YUAN, Y.; WOLFENDEN, R. (2005). The burden borne by urease. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (31): 10828-10829.
- CAMBUÍ, C.A.; GASPAR, M.; MERCIER, H. (2009). Detection of urease in the cell wall and membranes from leaf tissues of bromeliad species. *Physiol Plantarum.* 136: 86-93.
- CAO, F.Q.; WERNER, A.K.; DAHNCKE, K.; ROMEIS, T.; LIU, L.H.; WITTE, C.P. (2010): Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism. *Plant.Physiol.* 154: 98-108.
- CARLINI, C. & LIGABUE-BRAUN, R. (2016). Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon* 110: 90-109.

- CZABAN, W.; JÄMTGÅRD, S.; NÄSHOLM, T.; RASMUSSEN, J.; NICOLAISEN, M.; FOMSGAARD, I. (2016). Direct acquisition of organic N by white clover even in the presence of inorganic N. *Plant and Soil*. 407: 91-107.
- DIXON, N.E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R.L.; ZERNER, B. (1975). Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. *J. Am. Chem. Soc.* 97: 4131-4133.
- ENDRES, L. & MERCIER, H. (2001). Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *J. Plant. Nutr.* 24(1): 29-42.
- FOLLMER, C.; WASSERMANN, G.E.; CARLINI, C.R. (2004). Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science* 167: 241-246.
- FOLLMER, C. (2008). Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* 69: 18-28.
- FORDE, B.G.; LEA, P.J. (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *J Exp Bot.* 58 (9): 2339-2358.
- FREYERMUTH, S.K.; BACANAMWO, M.; POLACCO, J.C. (2000). The soybean *Eu3* gene encodes a Ni-binding protein necessary for urease activity. *Plant J.* 21: 53-60.
- GEIGER, M.; WALCH-LIU, P.; ENGELS, C.; HARNECKER, J.; SCHULZE, E.D.; LUDEWIG, F.; SONNEWALD, U.; SCHEIBLE, W.R.; STITT, M. (1998). Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 21: 253-268.
- GEIGER, M.; HAAKE, V.; LUDEWIG, F.; SONNEWALD, U.; STITT, M. (1999). The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant Cell Environ.* 22: 1177-1199.
- GERENDÁS, J. & SATTELMACHER, B. (1997). Significance of Ni supply for growth, urease activity and the concentrations of urea, amino acids and mineral nutrients of urea grow plants. *Plant Soil* 190: 153-162.
- GERENDÁS, J.; ZHU, Z. & SATTELMACHER, B. (1998). Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1545-1554.
- GONÇALVES, A.Z.; MERCIER, H.; OLIVEIRA, R.S.; ROMERO, G.Q. (2016). Trade-off between soluble protein production and nutritional storage in Bromeliaceae. *Ann. Bot.* 118(6): 1199-1208.
- GULLBERG, J.; JONSSON, P.; NORDSTRÖM, A.; SJÖSTRÖM, M.; MORITZ, T. (2004). Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem.* 331 (2): 283-295.
- HATTORI, A. (1958). Studies on the metabolism of urea and other nitrogenous compounds in *Chlorella ellipsoidea* .2. Changes on levels of amino acids and amides during the assimilation of ammonia and urea by nitrogen-starved cells. *J Biochem-Tokio.* 45 (1): 57-64.

- HOGAN, M.E.; SWIFT, I.E.; DONE, J. (1983) Urease assay and ammonia release from leaf tissues. *Phytochemistry* 22: 663-667.
- INSELSBACHER, E.; CAMBUI, C.A.; RICHTER, A.; STANGE, C.F.; MERCIER, H.; WANEK, W. (2007). Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytol* 175(2):311-320.
- JABRI, E.; CARR, M. B.; HAUSINGER, R.P.; KARPLUS, P.A. (1995). The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science*, 268, 998-1004.
- KANAMORI, T.; KANOU, N.; ATOMI, H.; IMANAKA T. (2004). Enzymatic characterization of a prokaryotic urea carboxylase. *J. Bacteriol.* 186: 2532-2539.
- KNUDSON, L. (1946). A new nutrient solution for germination for orchid seed. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 15: 214-217.
- KOT, M & ZABORSKA, W. (2006). Inhibition of jack bean urease by tetrachloro-o-benzoquinone and tetrachloro-p-benzoquinone. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 21(5): 537-542
- KRAJEWSKA, J. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 59: 9-21.
- LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G.M. (1996). The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47: 569-593.
- LAM, H.M.; CHIAO, Y.A.; LI, M.W.; YUNG, Y.K.; JI, S. (2006). Putative nitrogen sensing systems in higher plants. *Journal of Integrative Plant Biology.* 48: 873-888.
- LIN, C.Y.; YEH, D.M. (2008). Potassium nutrition affects leaf growth, anatomy, and macroelements of *Guzmania*. *Hort Sci* 43: 146-148.
- LOPEZ, L.C.S.; RODRIGUES, P.J.F.P.; RIOS, R.I. (1999). Frogs and snakes as phoretic dispersal agents of bromeliad ostracods (Limnocytheridae: Elpidium) and annelids (Naididae: Dero). *Biotropica* 31: 705-708.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; REISDORF-CREN, M.; PAGEAU, K.; LELANDAIS, M.; GRANDJEAN, O.; KRONENBERGER, J.; VALADIER, M.H.; FERAUD, M.; JOUGLET, T.; SUZUKI, A. (2006). Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiol.* 140: 444-456.
- MATIZ, A.; MIOTO, P.T.; AIDAR, M.P.M.; MERCIER, H. (2017). Utilization of urea by leaves of bromeliad *Vriesea gigantea* under water deficit: much more than a nitrogen source. *Biol. Plantarum*. doi:10.1007/s10535-017-0721-z.
- MCCULLOUGH, H. (1967). The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin Chim Acta.* 17(2): 297-304.
- MEDINA, E.; ZIEGLER, H.; LÜTTGE, U.; TRIMBORN, P.; FRANCISCO, M. (1994). Light conditions during growth as revealed by $\delta^{13}\text{C}$ values of leaves of primitive cultivars of *Ananas comosus*, an obligate CAM species. *Funct Ecol.* 8: 298-305.

- MÉRIGOUT, P.; LELANDAIS, M.; BITTON, F.; RENOU, J-P.; BRIAND, X.; MEYER, C.; DANIEL-VEDELE, F. (2008). Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in arabidopsis plants. *Plant Physiol* 147:1225–1238.
- MIFLIN, B. J. & LEA, P. J. (1980). Ammonia assimilation. In: MIFLIN, J. (1980). *Biochemistry of Plants*. 5: 169-202. London: Academic Press.
- MIFLIN, B.J., AND HABASH, D.Z. (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exp. Bot.* 53:979–987.
- MOBLEY, H.L.T.; ISLAND, M.D.; HAUSINGER, R.P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59: 451–480.
- MONCRIEF, M.B.C.; HOM, L.G.; JABRI, E.; KARPLUS, P. A.; HAUSINGER, R.P. (1995). Urease activity in the crystalline state. *Protein Sci.* 4: 2234–2236.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- NÄSHOLM, T.; KIELLAND, K.; GANETEG, U. (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol* 182: 31–48.
- PARK, I.S. & HAUSINGER, R.P. (1993). Site-directed mutagenesis of *Klebsiella aerogenes* urease: identification of histidine residues that appear to function in nickel ligation, substrate binding, and catalysis. *Protein Sci.* 2: 1034–1041.
- PEARSON, M.A.; MICHEL, L.O.; HAUSINGER, R.P.; KARPLUS, P.A. (1997). Structures of Cys319 variants and acetohydroxamate-inhibited *Klebsiella aerogenes* urease. *Biochemistry* 38: 8164–8172.
- PERSSON, J.; NÄSHOLM, T. (2001). Amino acid uptake: a widespread ability among boreal forest plants. *Ecol Lett* 4: 434-438.
- POLACCO, J.C. (1977). Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. II. Urea utilization and urease synthesis require Ni^{2+} . *Plant Physiol.* 59: 827–830.
- POLACCO, J.C.; KRUEGER, R.W.; WINKLER, R.G. (1985). Structure and possible ureide degrading function of the ubiquitous urease of soybean. *Plant Physiol* 79:794-800.
- POLACCO, J.C. & HOLLAND, M.A. (1993). Roles of urease in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 145: 65–103.
- POLACCO, J.C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. (2013). Opinion-Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. *Plant Sci.* 199-200:79-90.
- POPP, M.; JANETT, H.P.; LÜTTGE, U.; MEDINA, E. (2003). Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C_3 bromeliads. *New Phytol.* 157: 649-656.
- REINERT, F. & MEREILLES, S. (1993). Water acquisition strategy shifts in the heterophyllous saxicolous bromeliad *Vriesea geniculata* (Wawra) Wawra. *Selbyana* 14: 80–88.

- ROMERO, G.Q.; MAZZAFERA, P.; VASCONCELLOS-NETO, J.; TRIVELIN, P.C.O. (2006). Bromeliad-living spiders improve host plant nutrition and growth. *Ecology*, 87(4): 803-808.
- ROMERO, G.Q.; VASCONCELLOS-NETO, J.; TRIVELIN, P.C.O. (2008). Spatial variation in the strength of mutualism between a jumping spider and a terrestrial bromeliad: Evidence from the stable isotope ^{15}N . *Acta Oecologica*, 33(3): 380–386.
- ROMERO, G.Q.; NOMURA, F.; GONÇALVES, A.Z.; DIAS, N.Y.N.; MERCIER, H.; CONFORTO, E.C.; ROSSA-FERES, D.C. (2010). Nitrogen fluxes from treefrogs to tank epiphytic bromeliads: an isotopic and physiological approach. *Oecologia*, 162: 941–949.
- SAKAI, W.S. & SANDFORD, W.G. (1980). Ultrastructure of the water-absorbing trichomes of pineapple (*Ananas comosus*, Bromeliaceae). *Ann. Bot.* 46: 7-11.
- SALAMA, A.M.S. & WAREING, D.A. (1979). Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Exp. Bot.* 30: 971-981.
- SCHEIBLE, W.R.; KRAPP, A.; STITT, M. (2000). Reciprocal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant Cell Environ* 23: 1155–1167.
- SIRKO, A. & BRODZIK, R. (2000). Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim. Pol.* 47: 1189–1195.
- SOTO, G.; ALLEVA, K.; MAZZELLA, M.A.; AMODEO, G.; MUSCHIETTI, J.P. (2008). AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed Arabidopsis pollen-specific aquaporins, transport water and urea. *FEBS Lett.* 582: 4077–4082.
- STEBBINS, N.; HOLLAND, M.A.; CIANZIO, S.R.; POLACCO, J.C. (1991). Genetic tests of the roles of the embryonic ureases of soybean. *Plant Physiol* 97:1004-1010.
- SUMNER, J. B. (1926). Isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 69: 435–441.
- TAKAHASHI, C. A.; CECCANTINI, G. C. T.; MERCIER, H. (2007). Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19 (2): 119-126.
- TAKAHASHI, C.A.; MERCIER, H. (2011). Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *J Plant Physiol.* 168: 1208-1216.
- TAKAHASHI, C.A. (2014). Assimilação do nitrogênio em folhas de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae) durante a transição ontogenética do hábito atmosférico para o epifítico com tanque. Tese de doutorado, USP. São Paulo.
- TERCÉ-LAFORGUE, T.; MÄCK, G.; HIREL, B. (2004). New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source–sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. *Physiol Plantarum*. 120: 220–228.
- THOMAS, W.H. & KRAUSS, R.W. (1955). Nitrogen metabolism in *Scenedesmus* as affected by environmental changes. *Plant Physiol* 30: 113-122.

- TOMLINSON, P.B. (1969). Anatomy of monocotyledons. iii commelinales-zingiberales. oxford university press. Em: Luttge, U. (1989). Vascular plants as epiphytes. Evolution and Ecophysiology. Ed Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 112-115. Germany.
- URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; BAXTER, C.; KOLBE, A.; KOPKA, J.; SWEETLOVE, L.J.; FERNIE, A.R. (2005). Profiling of diurnal patterns of metabolite and transcript abundance in potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Planta* 221: 891–903.
- VANHOUTTE, B.; SCHENKELS, L.; CEUSTERS, J.; DE PROFT, M.P. (2017). Water and nutrient uptake in Vriesea cultivars: Trichomes vs. Roots. *Environ Exp Bot.* 136: 21–30.
- WALKER, J.B. (1952). Arginosuccinic Acid from Chlorella. *Proc Natl Acad Sci* 38(7): 561–566.
- WANG, W.H.; KÖHLER, B.; CAO, F.Q.; LIU, L.H. (2008) Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Sci.* 175: 467-477.
- WERNER, A.K.; ROMEIS, T.; WITTE, C.P. (2010). Ureide catabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* 6 :19–21.
- WIEBKE-STROHM, B.; LIGABUE-BRAUN, R.; RECHENMACHER, C.; DE OLIVEIRA-BUSATTO, L.A.; CARLINI, C.R.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. (2016). Structural and transcriptional characterization of a novel member of the soybean urease gene family. *Plant Physiol Biochem* 101:96-104.
- WINKLER, R.G.; POLACCO, J.C.; ESKEW, D.L.; WELCH, R.M. (1983). Nickel is not required for apourease synthesis in soybean seeds. *Plant Physiol.* 72: 262–263.
- WINKLER, R.G.; BLEVINS, D.G.; POLACCO, J.C.; RANDALL, D.D. (1988). Ureide catabolism in nitrogen-fixing legumes. *Trends Biochem Sci.* 13:97-100.
- WINKLER, U., ZOTZ, G. (2009). Highly efficient uptake of phosphorus in epiphytic bromeliads. *Ann. Bot.* 103: 477–484.
- WINTER, G.; TODD, C.D.; TROVATO, M.; FORLANI, G.; FUNCK, D. (2015). Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* 6: 534.
- WITTE, C.P.; MEDINA-ESCOBAR, N. (2001). In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Anal Biochem.* 290 (1):102-7.
- WITTE, C.P.; TILLER, S.A.; TAYLOR, M.A.; DAVIES, H.V. (2002). Leaf urea metabolism in potato. urease activity profile and patterns of recovery and distribution of ¹⁵N after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiol.* 128: 1129–1136.
- WITTE, C.P.; ROSSO, M.G.; ROMEIS, T. (2005). Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 1155–1162.
- WITTE, C.P. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science.* 180: 431–438.
- ZABORSKA, W.; KRAJEWSKA, B.; KOT, M.; KARCI, W. (2007). Quinone-induced inhibition of urease: Elucidation of its mechanisms by probing thiol groups of the enzyme. *Bioorganic Chemistry* 35: 233–242.

- ZAMBELLI, B.; MUSIANI, F.; BENINI, S.; CIURLI, S. (2011). Chemistry of Ni²⁺ in Urease: Sensing, trafficking, and catalysis. *Accounts of chemical research*. 44(7): 520–530.
- ZANIN, L.; TOMASI, N.; ZAMBONI, A.; VARANINI, Z.; PINTON, R. (2015). The urease inhibitor nbpt negatively affects dur3-mediated uptake and assimilation of urea in maize roots. *Front Plant Sci*. 6: 1007.
- ZANIN, L.; VENUTI, S.; TOMASI, N.; ZAMBONI, A.; DE BRITO FRANCISCO, R.M.; VARANINI, Z.; PINTON, R. (2016). Short-term treatment with the urease inhibitor n-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) alters urea assimilation and modulates transcriptional profiles of genes involved in primary and secondary metabolism in maize seedlings. *Front. Plant Sci*. 7:845.
- ZOTZ, G.; REICHLING, P.; VALLADARES, F. (2002). A simulation study on the importance of size-related changes in leaf morphology and physiology for carbon gain in an epiphytic bromeliad. *Ann. Bot*. 90: 437-443.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A ureia vem sendo cada vez mais caracterizada como uma fonte muito importante de nitrogênio orgânico e de carbono para as plantas. Cabe salientar que a produção agrícola está baseada na aplicação de ureia como principal adubo, devido ao seu baixo custo e alto conteúdo de nitrogênio (46% N por massa molecular). Entretanto, mais da metade do nitrogênio aplicado na agricultura não é absorvido pelas plantas resultando na poluição das águas e da atmosfera por amônio e óxidos de nitrogênio. As elevadas perdas de ureia (aplicada como adubo) em determinados solos são devidas à alta atividade da urease dos microorganismos, que rapidamente convertem a ureia a amônia e esta se perde por volatilização. Entretanto, pode-se imaginar um cenário em que essas perdas poderiam diminuir substancialmente, caso as plantas absorvessem e assimilassem de maneira mais eficiente essa fonte orgânica de nitrogênio. Para tanto é de grande relevância conhecer os elementos envolvidos nesses processos e mais ainda, em plantas que naturalmente costumam receber fontes orgânicas de nitrogênio (ureia), como por exemplo, as bromélias epífitas, as quais podem receber altas concentrações de ureia através das excretas de anfíbios.

Em *Vriesea gigantea*, uma bromélia epífita formadora de tanque, foi constatada sua alta capacidade em absorver essa fonte nitrogenada quando disponível em altas concentrações.

Com a finalidade de aprofundar os conhecimentos anteriormente obtidos, priorizando a importância da absorção e assimilação do nitrogênio orgânico, o presente trabalho visou analisar a absorção de ureia através de aquaporinas e a importância da urease no processo de assimilação de ureia

Baseando-se nos resultados obtidos pudemos concluir:

1) CAPÍTULO I:

- VgTIP2 apresenta em sua sequência o filtro seletivo His-Ile-Gly-Arg, de caráter mais hidrofílico e previamente caracterizado em AtTIP2,1, aquaporina capaz de transportar água, ureia e amônia. Ensaios de expressão heteróloga em ovócitos de *X. laevis* e em linhagem mutante de levedura YNVW1 demonstraram a permeabilidade de VgTIP2 à água e ureia, mas não à amônia. Entretanto, não foi possível determinar experimentalmente sua localização subcelular, sendo que ensaios *in silico* sugerem que essa proteína esteja localizada na membrana vacuolar, provavelmente regulando o estoque de ureia no vacúolo e atuando, dessa forma, na detoxificação do excesso de ureia acumulado. A realização de ensaios complementares de

localização celular em células ou protoplastos isolados poderia esclarecer se essa proteína é direcionada para a membrana plasmática, onde atuaria também na absorção da ureia do meio.

- As análises *in silico* não sugeriram para VgPIP1;2 a capacidade de transporte de nenhum dos solutos classicamente transportados por aquaporinas. No entanto, VgPIP1,2 se mostrou capaz de transportar $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ em ensaios heterólogos com a linhagem mutante de levedura $\Delta\text{mep1-3}$ (31019b). Esses resultados incluem a sequência assinatura de filtro seletivo F-H-T-R, já relacionada ao transporte de uma ampla gama de moléculas, como CO_2 , H_2O_2 , ácido bórico e ureia, em adição às sequências descritas na literatura para aquaporinas transportadoras de amônia (W-V-A-R e H-I-G-R), sugerindo que a presença dessa sequência resulte em um poro menos seletivo.
- Apesar de não ter sido testado funcionalmente, estudos *in silico* indicaram a VgPIP1;5 como transportadora de CO_2 . Análises funcionais em *X. laevis* confirmaram somente o transporte de água para essa proteína, quando co-expressa com outra da subfamília PIP2. A maior similaridade de sequência com proteínas do tipo PIP1,1, a ausência de capacidade de transporte de ureia e a necessidade de co-expressão com PIP2 para o transporte de água sugerem que essa proteína de *V. gigantea* não seja a ortóloga de ZmPIP1,5, devendo ser considerada a possibilidade de renomeá-la como VgPIP1,1.
- De maneira interessante, o conjunto dos resultados sugere que *V. gigantea* poderia ter um sistema muito eficiente não somente de transporte de ureia, mas também de transporte dos produtos da hidrólise de ureia, amônio e CO_2 , atuando na nutrição e na detoxificação de ureia e amônia.

2) CAPÍTULO II:

- Usando a estratégia de inibição da atividade da urease (através da aplicação de cloranil) para conhecer a relevância da urease no processo de assimilação da ureia, foi possível reduzir significativamente a atividade da urease nas duas fases ontogenéticas e em todos os órgãos, assim como, diminuir os teores de amônio provenientes da ureia (isotópico+1);
- As plantas atmosféricas de *V. gigantea* possuem um evidente consumo de luxo uma vez que mostraram uma alta capacidade em acumular amônio, ureia e aminoácidos em quantidades superiores às registradas em plantas adultas-tanque quando fornecida a ureia;

- A análise do perfil de aminoácidos e seus isotopólogos em plantas tratadas com o inibidor da urease, mostrou que em plantas atmosféricas a diminuição na atividade da urease afeta principalmente a formação de Gln devido à diminuição do amônio disponível. Enquanto que em plantas adultas-tanque a inibição da urease afeta principalmente os processos de transaminação, uma vez que, o Glu é usado principalmente para a manutenção do ciclo GS/GOGAT reduzindo o *pool* que seria destinado para processos de transaminação. Estas diferenças entre as fases ontogenéticas com respeito à assimilação de ureia podem ser devidas às diferenças morfológicas que apresentam. Assim, as plantas atmosféricas precisariam assimilar mais rapidamente a ureia quando disponível, uma vez que não possuem um tanque para armazenar os nutrientes por mais tempo, precisando, então, metabolizar a ureia prontamente.
- As plantas controle e tratadas com o inibidor não apresentaram uma diferença significativa na proporção dos diferentes isotopólogos dos aminoácidos, indicando que em ambas as situações a mesma via de assimilação de ureia foi utilizada. Mesmo que uma redução na assimilação do N ou na sua transaminação tenha sido observada em plantas tratadas com o inibidor quando fornecida a ureia. Assim, o processo de assimilação do N proveniente da ureia parece acontecer principalmente via GS/GOGAT com prévia ação da urease. Além disso, o processo de assimilação direta de ureia em plantas de *V. gigantea* (sem prévia hidrólise da uréia) parece improvável de ocorrer, pelo menos através da incorporação de ureia em arginina.

Mesmo trazendo mais informações sobre o metabolismo e absorção do nitrogênio, ainda restam muitos questionamentos a serem respondidos:

1) Uma vez que foi visto que VgPIP1;2 e VgPIP1;5 precisam estar associadas a PIP2s para seu correto tráfego para a membrana, seria interessante determinar quais PIP2s em *V. gigantea* são as responsáveis pela referida função;

2) Qual seria a localização subcelular da VgTIP2? Poderia esta aquaporina estar de fato na membrana plasmática mediando a passagem de ureia do meio externo para dentro da célula, ao invés de participar exclusivamente no seu armazenamento no vacúolo?

3) Uma vez que, VgTIP2 e VgPIP1;2 mostraram-se funcionais para o transporte de ureia e $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, respectivamente, seria interessante confirmar funcionalmente o dado *in silico* que sugere que VgPIP1;5 transportaria CO_2 . Dessa maneira, *V. gigantea* teria um sistema eficiente de transporte não somente de ureia, mas também de seus produtos de hidrólise, amônio e CO_2 ;

4) Adicionalmente, desconhece-se se o aumento de expressão destas aquaporinas se deve à presença de ureia na sua forma intacta, ou se o estímulo seria igualmente desencadeado pelo amônio previamente liberado pela hidrólise da ureia. Caso as respostas sejam diferentes,

isso geraria indícios da existência de uma indução diferencial dessas aquaporinas frente às duas fontes nitrogenadas. Mais ainda, desconhece-se se a expressão das aquaporinas de *V. gigantea* pode ser órgão-específica e/ou variar ao longo do desenvolvimento da planta;

5) Visando uma aplicabilidade biotecnológica, seria interessante analisar, em termos cinéticos, a velocidade de transporte de ureia através de VgTIP2 comparativamente com outras aquaporinas transportadoras de ureia de culturas de interesse agrícola. Assim, VgTIP2 pode-se mostrar mais eficiente do que outras aquaporinas no transporte de ureia, sendo um gene candidato interessante para transformação visando aumentar a capacidade de absorção de ureia de plantas cultivadas;

6) Uma vez absorvida a ureia, esta deve ser metabolizada para sua assimilação. Como visto neste trabalho existem claras evidências da importância da urease nesse processo, e mais ainda, sua atividade parece variar segundo o órgão e o estágio ontogenético. Entretanto, não foi estudada a expressão gênica da apo-urease (UreU), assim como, a chaperona responsável pela sua ativação (UreG) e se o nível de expressão estaria correlacionado com os níveis de atividade enzimática observados em cada órgão;

7) Adicionalmente, visando entender melhor as dinâmicas de assimilação do amônio proveniente da ureia, é de grande importância conhecer a distribuição da atividade da enzima GOGAT nos diferentes órgãos;

8) Por fim, seria interessante conhecer as respostas de *V. gigantea* frente a baixas concentrações de ureia, simulando condições de baixa disponibilidade desta fonte no ambiente ou em situações em que a ureia disponível no tanque diminui com o passar do tempo. Nesse cenário, conhecer como funcionam os sistemas de alta afinidade de absorção de ureia (homólogos a DUR3) e sua assimilação também são de grande importância para o entendimento do metabolismo da ureia nessa espécie.

RESUMO

ABSTRACT

1. RESUMO

As moléculas orgânicas podem ser a principal entrada de nitrogênio para plantas em ambientes onde as fontes inorgânicas de nitrogênio são limitadas, como o ambiente epífitico. Estudos recentes têm mostrado que plantas de *Vriesea gigantea*, uma bromélia epífita formadora de tanque, possuem alta capacidade de absorver ureia, fazendo dela um excelente modelo para estudar o metabolismo de ureia. Entretanto, os processos de absorção e assimilação de ureia estão pouco caracterizados nessas plantas. Várias aquaporinas de plantas têm mostrado ser capazes de facilitar a difusão de ureia através das membranas. Três genes que codificam para aquaporina foliares, *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* e *VgTIP2*, recentemente foram clonados a partir de plantas *V. gigantea* tratadas com ureia, sendo que as expressões de *VgPIP1;5* e *VgTIP2*, foram induzidas por essa fonte nitrogenada. No entanto, não tinha sido testado funcionalmente se, de fato, essas aquaporinas seriam capazes de transportar ureia, amônio ou água através das membranas. Uma vez absorvida, a ureia precisa ser metabolizada. Sugere-se que a assimilação do N ocorra por meio da via GS/GOGAT, com prévia hidrólise da ureia pela enzima urease, fornecendo amônio e CO₂. Contudo, nunca se analisou a relevância da urease nesse processo em *V. gigantea*.

Dessa maneira, no presente trabalho o transporte de ureia, amônio e água através de *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* e *VgTIP2* foi determinado por meio de ensaios de absorção em ovócitos de *Xenopus laevis* (água e ureia) e de estudos de complementação em *Saccharomyces cerevisiae* (NH₄⁺/NH₃). Os resultados mostraram que, enquanto *VgTIP2* facilita o transporte de água quando expresso isoladamente em ovócitos, *VgPIP1;2* e *VgPIP1;5* precisaram de ser co-expressos com aquaporinas do tipo PIP2 para serem corretamente transportadas para a membrana plasmática e atuarem como canais de água. Além disso, *VgTIP2* foi a única aquaporina capaz de facilitar a difusão de ureia através das membranas, enquanto que *VgPIP1;2* parece ser capaz de transportar NH₄⁺/NH₃.

Adicionalmente, a relevância da urease no processo de assimilação de ureia foi analisada por meio do perfil isotópico dos aminoácidos em plantas de *V. gigantea* tratadas com um inibidor da urease (cloranil) antes de fornecer ureia duplamente marcada com C¹³ e N¹⁵. Os experimentos foram conduzidos em plantas nas fases ontogenéticas, atmosférica e adulta-tanque devido a existência de diferenças metabólicas e morfológicas. Os resultados sugeriram que a atividade da urease é um passo limitante na conversão do N da ureia em amônio para sua assimilação. Adicionalmente, foi visto que a diminuição na atividade da urease afeta principalmente a formação de glutamina (Gln) em plantas atmosféricas, enquanto que em plantas adultas-tanque a transaminação é o principal processo prejudicado. A diferença de assimilação de ureia entre as fases ontogenéticas podem ser consequência de diferenças

morfológicas associadas com estratégias para captar nutrientes. Além disso, apesar da diminuição da atividade da urease pela ação do inibidor, processos de assimilação direta (sem prévia hidrólise da ureia anterior) em plantas *V. gigantea* parecem improváveis de acontecer.

Palavras- chave: metabolismo de ureia, aquaporinas, urease, bromélias epífitas, *Vriesea gigantea*

2. ABSTRACT

Organic molecules can be the main input of nitrogen for plants in environments where inorganic nitrogen sources are limited, such as the epiphytic habitat. Recent studies have shown a high capacity of *Vriesea gigantea*, an epiphytic tank-forming bromeliad, to absorb urea by their leaves, making this bromeliad an excellent model to study urea metabolism. Nevertheless, urea uptake and assimilation processes are little characterized in these plants. Several plant aquaporins from different species are able to facilitate the diffusion of urea through the membranes. Three foliar aquaporin genes, *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* and *VgTIP2*, have been recently cloned from urea-treated *V. gigantea* plants. The expression of *VgPIP1;5* and *VgTIP2* was specifically up-regulated by urea in the basal part of the leaves. Nevertheless, it had not been tested whether these aquaporins were in fact capable of facilitating the membrane diffusion of either urea, ammonium or water. Moreover, it was suggested that after urea absorption, this organic N compound is hydrolyzed by the urease enzyme into CO₂ and NH₄⁺ prior to NH₄⁺ assimilation by the GS/GOGAT pathway.

In the present project, urea, NH₄⁺/NH₃ and water diffusion through *VgPIP1;2*, *VgPIP1;5* and *VgTIP2* were determined by uptake studies in *Xenopus laevis* oocytes (urea and water) and complementation assay in *Saccharomyces cerevisiae* (NH₄⁺/NH₃). The results showed that while *VgTIP2* facilitates water transport when expressed alone in oocytes, *VgPIP1;2* and *VgPIP1;5* needed to be co-expressed with a PIP2 aquaporin to be targeted to the plasma membrane and act as water channels. Moreover, *VgTIP2* was the only aquaporin able to facilitate the diffusion of urea through the membrane, while *VgPIP1;2* seems to be capable of transporting NH₄⁺/NH₃.

Additionally, the urease relevance in the urea assimilation process was investigated through the analysis of the amino acid profile in *V. gigantea* plants kept under a urease inhibitor (chloranil) and supplied with labeled [¹³C]-[¹⁵N]₂-urea. The experiments were conducted in atmospheric and adult-tank ontogenetic stages of *V. gigantea* due to their metabolic and morphological differences. The results suggested that urease activity may be a limiting step in the conversion of N from urea to ammonium. Moreover, decreases in urease activity by chloranil impaired the first steps in N assimilation, dropping the pool of glutamine (Gln) in atmospheric plants. In adult-tank plants the transamination appeared to be adversely affected. Those differences in urea assimilation might be due to differences in the morphology and the nutrient capture strategies of the ontogenetic phases. Finally, direct urea assimilation process (without previous urea hydrolysis) in *V. gigantea* plants seems unlikely to occur.

Key-words: urea metabolism, aquaporins, urease, epiphytic bromeliads, *Vriesea gigantea*

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1

Subfamília de MIPs	Aquaporina	Espécie	Número de acesso
PIP1s	PIP1;1	<i>Zea mays</i>	(NP_001105466.1)
	PIP1;1	<i>Ananas comosus</i>	(ACB56912.1)
	PIP1	<i>Lilium sp</i>	(AGC24023.1)
	PIP1;1	<i>Oryza sativa</i>	(AFM37319.1)
	PIP1;1	<i>Juglans regia</i>	(ACR56610.1)
	PIP1;1	<i>Musa acuminata</i>	(AGT36590.1)
	PIP1	<i>Hevea brasiliensis</i>	(ACV66985.1)
	PIP1;1	<i>Posidonia oceanica</i>	(CAC85292.1)
	PIP1;1	<i>Triticum turgidum</i>	(ABW34453.1)
	PIP1;1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_191702.1)
	PIP1	<i>Gladiolus communis</i>	(AEO79975.1)
	PIP1	<i>Hedychium coronarium</i>	(AFJ44204.1)
	PIP1;B	<i>Theobroma cacao</i>	(XP_007051783.1)
	PIP1;1	<i>Morus notabilis</i>	(EXB58178.1)
	PIP1;1	<i>Quercus petraea</i>	(AFH36339.1)
	PIP1	<i>Xerophyta humilis</i>	(AAZ91447.1)
	PIP1;1	<i>Fraxinus excelsior</i>	(AAT74898.1)
	PIP1	<i>Gossypium hirsutum</i>	(ABD63904.1)
	PIP1;2	<i>Zea mays</i>	(NP_001104934.1)
	PIP1;2	<i>Vitis vinifera</i>	(NP_001267949.1)
	PIP1;2	<i>Populus sp.</i>	(CAH60718.1)
	PIP1;2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_182120.1)
	PIP1;2	<i>Craterostigma plantagineum</i>	(CAA04652.1)
	PIP1;3	<i>Vitis vinifera</i>	(XP_002276605.2)
	PIP1;3	<i>Quercus petraea</i>	(AFH36339.1)
	PIP1;3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_171668.1)
	PIP1;4	<i>Camelina sativa</i>	(AEH76328.1)
	PIP1;5	<i>Zea mays</i>	(NP_001105131.1)
	PIP1;5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_194071.1)
PIP2s	PIP2;1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_190910.1)
	PIP2;2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_181254.1)
	PIP2;3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_181255.1)
	PIP2;4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_200874.1)
	PIP2;8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_179277.1)
TIP1s	TIP1;1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_181221.1)
	TIP	<i>Ricinus communis</i>	(XP_002515999.1)
	TIP1;2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_189283.1)
	TIP1;3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_192056.1)

TIP2s	TIP2	<i>Lilium longiflorum</i>	(AFJ44205.1)
	TIP2;1	<i>Vitis vinifera</i>	(NP_001267958.1)
	TIP2;1	<i>Solanum lycopersicum</i>	(BAO18634.1)
	TIP2;1	<i>Morus notabilis</i>	(EXB74548.1)
	TIP2;1	<i>Quercus petraea</i>	(AFH36343.1)
	TIP2;1	<i>Lolium perenne</i>	(ACR45958.1)
	TIP2;1	<i>Medicago truncatula</i>	(XP_003626979.1)
	TIP2;1	<i>Zea mays</i>	(ACG44020.1)
	TIP2;2	<i>Gossypium hirsutum</i>	(DAA33871.1)
	TIP2;2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_193465.1)
	TIP2;3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_199556.1)
	TIP2;3	<i>Gossypium hirsutum</i>	(ADE34289.1)
	TIP2;3	<i>Zea mays</i>	(NP_001104907.1)
	TIP2;5	<i>Solanum lycopersicum</i>	(BAO18637.1)
TIP4	TIP4;1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_180152.1)
TIP5s	TIP5;1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(NP_190328.1)
	TIP5;1	<i>Zea mays</i>	(NP_001105036.1)

ANEXO 2

Identidade das sequências de *V. gigantea* com algumas sequências de aquaporinas cuja estrutura terciária já foi resolvida por cristalografia. Estas foram levadas em consideração pela análise feita no servidor I-TASSER.

Proteína	SoPIP2;1	AtPIP2;1	AQP1 bovina	GlpF (<i>E.coli</i>)
VgPIP1;2	72%	37%	43%	31%
VgPIP1;5	74%	37%	45%	28%
VgTIP2	41%	77%	39%	31%

ANEXO 3

A localização de VgTIP2 nos ovócitos de *Xenopus* foi analisada com microscopia confocal para determinar se a sua fusão com YFP poderia afectar o seu tráfego para a membrana. O YFP-VgTIP2 foi encontrado na membrana plasmática, entretanto, uma forte fluorescência foi detectada na parte interna das células do ovócito indicando que o direccionamento desta para a membrana foi prejudicado (**Figura I.6D**). Consequentemente, o Pf dos ovócitos expressando YFP-VgTIP2 foi menor em comparação com o Pf dos ovócitos expressando VgTIP2. Esses dados sugerem que a falha no tráfego adequado de VgTIP2 para a membrana plasmática do ovócito foi causada pela sua fusão com YFP, resultando numa fraca actividade de aquaporina.

A figura mostra o P_f dos ovócitos expressando YFP-VgTIP2 ou VgTIP2. Os ovócitos foram injetados com água, 4 ng de cRNA de *VgTIP2* ou 8 ng de YFP-VgTIP2. Os resultados são expressos como a média $\pm$ DP de 10 a 15 ovócitos. Os asteriscos indicam as diferenças entre os ovócitos injetados com água (controle negativo) e os ovócitos injetados com cRNA de aquaporinas (t-Student; $p < 0,05$).

ANEXO 4

Concentração total de aminoácidos em folhas (porções apical e basal) e raízes de plantas atmosféricas (A-B) e adultas-tanque (C-D) de *V. gigantea*. Plantas controle (A e C) ou tratadas com o inibidor da urease (B e D) depois de 0, 7 e 24 horas do fornecimento de 5mM de $[^{13}\text{C}]$ - $[^{15}\text{N}]_2$ -ureia. A barra branca representa os 6 aminoácidos mais abundantes na planta (Gln, GABA, Ala, Asp, Glu e Ser). As barras pretas representam os outros 16 aminoácidos analisados.

ANEXO 5

A. Teores de GABA, Ala, Asp e Ser em plantas atmosféricas de *V. gigantea*.

B. Porcentagem dos isotopólogos dos aminoácidos GABA, Ala, Asp e Ser em plantas atmosféricas de *V. gigantea* após 0,7 e 24 horas de fornecida a ureia.

C. Teores de GABA, Ala, Asp e Ser em plantas adultas de *V. gigantea*.

D. Porcentagem dos isotopólogos dos aminoácidos GABA, Ala, Asp e Ser em plantas adultas de *V. gigantea* após 0,7 e 24 horas de fornecida a ureia.

ANEXO 6

Teores de asparagina (Asn) (e seus isotopólogos) em A) plantas atmosféricas e B) adultas-tanque de *V. gigantea*