

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**ERIK MONTAGNA**

**Hipótese evolutiva sobre a assimilação de  
compostos nitrogenados por metazoários:  
a limitação a  $\alpha$ -aminoácidos.**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
31/10/2008

ERIK MONTAGNA

**Hipótese evolutiva sobre a assimilação de  
compostos nitrogenados por metazoários:  
a limitação a  $\alpha$ -aminoácidos.**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências  
(Bioquímica)*

*Orientador: Prof. Dr. Bayardo B. Torres*

São Paulo  
2008

Erik Montagna

Hipótese evolutiva sobre a assimilação de compostos nitrogenados por metazoários:  
a limitação a  $\alpha$ -aminoácidos.

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências  
(Bioquímica).*

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico meus esforços à minha família,  
por não terem criado um pacóvio.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bayardo B. Torres, pela orientação, mas ainda mais ao Bayardo, por colocar prumo nas minhas idéias tortas e tentar (em vão, claro) contornar meu ímpeto com o exemplo de sua elegância;

À Dra. Francisca Carolina do Val, pelo suporte e incentivo acadêmico, mas ainda mais à Chica, por colocar lenha na fogueira das minhas idéias tortas e atíçar os demônios;

À Dra. Silvia Lopes de Menezes, pela ponderação e paciência, mas ainda mais à Silvinha por ser a conjunção adversativa que me faz pensar uma vez mais antes de *achar* qualquer coisa;

Ao pessoal do laboratório pela época do meu ingresso, por ser um dos ambientes mais estimulantes pra se trabalhar onde já tive a oportunidade de estar;

Aos orientadores que já tive nessa curta caminhada, Dra. Primavera Borelli e Dr. Pedro Soares de Araújo, pela luz nos primeiros passos, me fazendo mais chato, e por me permitirem ser mal-humorado e ranzinza sem achar que isso seja um desvio de caráter;

Aos colegas da caminhada pela paciência;

Ao CNPq pela bolsa concedida.

*“Há quanto tempo já está sentado  
sobre o teu infortúnio?  
Cuidado! Ainda chocarás  
um ovo,  
um ovo de basilisco  
de tua demorada miséria.”*

**Friedrich Nietzsche**, em “O Anticristo”

*“Espera-se que um cientista tenha conhecimento completo e profundo, em primeira mão, de alguns assuntos e, portanto, que não escreva sobre qualquer tópico no qual não seja um mestre. Isso é considerado algo de noblesse oblige. Para o propósito presente, peço licença para renunciar à noblesse, se há alguma, e ser liberado da obrigação resultante.”*

**Erwin Schrödinger**, no prefácio de seu livro “O que é Vida?”

## RESUMO

Montagna, E. **Hipótese evolutiva sobre a assimilação de compostos nitrogenados por metazoários: a limitação a  $\alpha$ -aminoácidos.** 2008. 90p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os modelos de evolução de vias metabólicas estão baseados em técnicas moleculares e bioinformática e nem sempre levam em consideração o contexto fisiológico e ecológico do organismo. Assim, tomando como plataforma o metabolismo de nitrogênio, procurou-se estabelecer uma hipótese evolutiva para o uso de  $\alpha$ -aminoácidos por metazoários como fonte de nitrogênio. O objetivo é traçar essa história evolutiva, contextualizando fisiológica e ecologicamente as alterações que ocorreram no perfil de utilização desses compostos. Para traçar essa história evolutiva, recorreu-se a dados disponíveis na literatura partindo-se dos elementos moleculares/metabólicos que compõem o ciclo do nitrogênio e em qual contexto geológico e evolutivo se deu tal história. Os dados obtidos, reorganizados e reestruturados nesse novo contexto, permitiram conclusões originais no presente trabalho, a saber: (1) a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico foi um fator de seleção natural positiva na transição da atmosfera redutora para oxidante; (2) os organismos fixadores de nitrogênio são bem mais disseminados do que o admitido classicamente; (3) o produto final da fixação biológica de nitrogênio *in vivo* são  $\alpha$ -aminoácidos, e foram um fator de pressão seletiva para os organismos incapazes de fixar nitrogênio; (4) os metazoários evoluíram posteriormente a esse cenário e seu aparato metabólico está mais adaptado para o aproveitamento líquido do nitrogênio obtido apenas na forma de  $\alpha$ -aminoácidos.

**Palavras-chave:** Fixação biológica de nitrogênio, nitrogenase, evolução do metabolismo de nitrogênio, ecologia de diazótrofos, metabolismo de nitrogênio em metazoários.

## ABSTRACT

Montagna, E. **Evolutionary hypothesis on the nitrogenous compounds uptake by metazoan: the limitation to  $\alpha$ -aminoacids**. 2008. 90p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Metabolic pathway evolution models are molecular and computational based, and do not take account the physiological and ecological contexts in which organisms are inserted. Thus using the nitrogen metabolism as a platform, an evolutionary hypothesis on the  $\alpha$ -amino acids utilization by metazoans was proposed. The objective of the present work is to trace an evolutionary history of the nitrogen usage by metazoans taking account the profile changes on a physiological and ecological basis. In order to trace this evolutionary history, a scrutiny were performed in the specialized literature aiming at data about the molecular and metabolic elements which perform the nitrogen cycle and in which geologic and evolutive context has passed such history. The reorganization of obtained data in a new context allowed original conclusions in the present work as follows: (1) the capability of fixing the atmospheric nitrogen was a positive selection factor in the atmospheric condition transition from reductive to oxidant; (2) nitrogen fixing organisms are far most wide spread than classically admitted; (3)  $\alpha$ -amino acids are the biological nitrogen fixation end product *in vivo*, and are a selective factor for non-fixing organisms; (4) metazoans evolved afterwards in these scenario and their metabolic apparatus is adapted to the nitrogen net utilization obtained in the  $\alpha$ -amino acid form.

**Keywords:** Biological nitrogen fixation, nitrogenase, nitrogen metabolism evolution, diazotroph ecology, metazoan nitrogen metabolism evolution.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>FBN</b>	Fixação biológica de nitrogênio
<b>GDH</b>	Glutamato desidrogenase
<b>Gln</b>	L-glutamina
<b>Glu</b>	L-glutamato
<b>GOGAT</b>	Glutamina-oxoglutarato amino transferase
<b>GS</b>	Glutamina sintetase
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>NADH</b>	Nicotinamida dinucleotídeo
<b>NADPH</b>	Nicotinamida dinucleotídeo fosfato

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Preâmbulo.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 As abordagens no estudo da evolução de vias metabólicas.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Onde contribuir sem fazer mais do mesmo.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Justificativas da escolha.....</b>	<b>20</b>
1.4.1. Relação entre “injeção” e drenagem de amônio.....	20
1.4.1.1. A fixação biológica de nitrogênio.....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3. PROCEDIMENTOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1. Origem e evolução das nitrogenases: a questão das condições atmosféricas.....</b>	<b>35</b>
4.1.1. Nitrogenase.....	35
4.1.2. Estrutura.....	36
4.1.3. Função fisiológica e ecológica.....	41
4.1.4. Origem e evolução das nitrogenases.....	43
<b>4.2. Mudança do papel fisiológico das nitrogenases e as conseqüências ecológicas.....</b>	<b>48</b>
4.2.1. Proteção do complexo nitrogenase contra oxigênio molecular....	48
4.2.2. A ecologia dos diazótrofos.....	52
4.2.2.1. Solo.....	52
4.2.2.2. Água-doce e alagados/mangues.....	53
4.2.2.3. Água/Ambiente aquático .....	53
4.2.2.4. Intracelular .....	55
4.2.2.5. Endofíticos .....	56

4.2.2.6. Insetos.....	58
4.2.2.7. Rizosfera do árido e deserto .....	60
4.2.2.8. Líquenes.....	61
<b>4.3. Produto final das nitrogenases in vivo.....</b>	<b>64</b>
4.3.1. Produtos resultantes do metabolismo orquestrado da malha onde a nitrogenase é o ponto inicial.....	64
<b>4.4. A captação de nitrogênio pelos metazoários.....</b>	<b>68</b>
4.4.1. Glutamato desidrogenases (GDH).....	68
4.4.2. Por que as GDH não são o ponto de entrada em metazoários....	72
4.4.3. Mudando o foco da GDH para as aminotransferases.....	74
<b>5. SÍNTESE FINAL.....</b>	<b>77</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>88</b>
<b>Súmula curricular.....</b>	<b>88</b>

# 1. Introdução

## 1.1 Preâmbulo

Uma das grandes realizações da Bioquímica e da Biologia Molecular tem sido a elucidação de muitos mecanismos que serviram de fundamento e alicerce para o estudo mais detalhado dos sistemas vivos. Processos comuns de transformação de energia, catálise e a organização e processamento do código genético atestam a unidade existente nos mecanismos da vida no nível molecular.

Não há possibilidade de negar o triunfo dessa abordagem reducionista à Biologia Celular e esses avanços permitiram a elaboração de princípios unificadores para os fenômenos da vida sob um prisma eminentemente mecanístico (Hochachka, 1999). Entretanto, essa abordagem não trouxe maior iluminação a muitos questionamentos sobre as formas como se adaptaram e evoluíram aqueles mecanismos. Estas formas constituem a base da imensa diversidade biológica observada na natureza. As bases estruturais e funcionais que sustentam os modos de vida tão radicalmente diversos observados na natureza estão apoiadas numa série de mecanismos comuns e o questionamento sobre como esses mecanismos são tão disseminados e em situações tão diversas, não é novo (Hochachka e Somero, 1984).

Muitos trabalhos dedicados à Bioquímica comparada e adaptativa são encontrados na literatura especializada. Estes trabalhos descrevem longamente os processos bioquímicos em ambientes extremos e notáveis adaptações a ambientes inóspitos sob uma série de pontos de vista (Hochachka, 1993). Mais recentemente, alguns trabalhos passaram a exibir asserções sobre os mecanismos evolutivos dessas modificações tão drásticas no escopo fisiológico, mas tão discretas sob o

ponto de vista mecanístico do metabolismo. Ainda que tímidas em muitos casos, essas asserções são geralmente restritas a alguns grupos de seres vivos para os quais havia mais dados disponíveis na literatura (Prestwich e Ing, 1982; McManus, 1987; Bradley, 2000; Andjus *et al.*, 2000; Jackson e Nicholson, 2002).

O rápido avanço das técnicas da Biologia Molecular e o concomitante avanço da Bioinformática permitiu a análise de genomas e proteomas, sob o filtro de austeros modelos matemáticos e vigoroso processamento computacional, e fez com que os modelos biológicos estivessem mais próximos da matemática e de leis algorítmicas do que necessariamente das Ciências Biológicas e das nuances que acompanham seu estudo (Davis, 1998). Isso de forma alguma constitui restrição a essa abordagem, já que avanços importantes se deram sob as práticas dessas metodologias, que são constantemente refinadas; ainda assim, publicações recentes criticam o distanciamento e a refratariedade de alguns setores da pesquisa em Bioquímica em aceitar completamente essas ferramentas (Donoho *et al.*, 2005).

Essa situação poderia parecer ambígua não fossem as limitações admitidas para os modelos computacionais. Esses modelos são baseados em algoritmos e assunções que nem sempre levam em conta a ampla plasticidade apresentada por muitos sistemas biológicos, mesmo num nível de análise puramente fisiológico. Por mais poderosas que sejam as ferramentas computacionais, ainda são admitidas limitações técnicas para processamentos de grande porte e com o cruzamento de muitos dados. Mesmo com refinadas ferramentas estatísticas, a interpretação desses dados ainda merece certa cautela, o que não significa que eles não sejam confiáveis.

A questão a ser levantada nesse ponto é a evidente dificuldade de medição objetiva da complexidade de um sistema e das possibilidades de propor modelos

que contemplem a evolução de sistemas complexos. A forma como as vias metabólicas evoluem está baseada em modelos que estão sendo revistos, pois baseiam-se na evolução de enzimas numa via metabólica estanque e com pouca ou sem relação com outros pontos do metabolismo. Nisto reside a limitação desses modelos, tanto o modelo de retro-evolução (Horowitz, 1945) como o de recrutamento seletivo (Jensen, 1976), que não levam em consideração a malha metabólica em sua amplitude, em interação com o metabolismo celular global. Para condições limite de vida primordial, é possível que estes modelos sejam explicativos, assumindo que a evolução inicial das vias metabólicas se deu de forma praticamente unidirecional (Russel e Martin, 2004). Entretanto, com o aumento da complexidade dos sistemas e das estruturas, esses modelos passam a apresentar restrições mais severas.

Modelos mais recentes já estudam o metabolismo num contexto de malha complexa e com suporte computacional na análise de homologias entre enzimas de diversos organismos e levando em consideração pontos mais distantes das vias em que estas enzimas estão primariamente envolvidas. Assim, modelos como o da evolução enzimática local e de evolução enzimática a longa distância, passam a contemplar a maior amplitude e complexidade das malhas metabólicas (Alves *et al.*, 2002).

Nesses modelos, além de parâmetros como porcentagem de similaridade e distância genética, outros ainda são considerados, como superfamílias ultraestruturais, tipo de substrato consumido e natureza da reação química envolvida. Esses dados estão disponíveis em diversos bancos de dados e constituem ferramenta valiosa na análise das malhas. Com isso, tantos fatores quanto sejam cabíveis na análise matemática ou suportados pelas ferramentas

computacionais são agregados e minuciosamente comparados, fornecendo novas possibilidades para a análise evolutiva das malhas.

Entretanto, mesmo esses novos modelos nem sempre apresentam solidez ou a necessária coerência em níveis de análise muito amplos. Muitos deles acabam sendo limitados pela pequena escala de abrangência dos estudos. Podem ser delineados a partir de estudos em um único organismo (Tsoka e Ouzounis, 2001) ou ainda na análise de um determinada superfamília de enzimas (Copley e Bork, 2000) sobre os quais são feitas considerações sobre a forma como evoluem as vias. Uma crítica cabível a esses estudos é muitas vezes a falta de consonância entre os autores quanto ao significado biológico, bioquímico e evolutivo dos dados obtidos.

Nota-se que ainda não há elementos técnicos e teóricos que suportem a unificação ou maior concordância entre os dados obtidos e os modelos para fenômenos evolutivos e adaptativos que vêm sendo propostos. Mesmo dentro da teoria da evolução num escopo mais amplo, há algum tempo são propostos esforços no sentido de maior agregação entre as áreas que estudam evolução (Brooks, 1983), visando incorporar de forma harmônica a grande diversidade de conhecimento que vem sendo gerado.

## **1.2 As abordagens no estudo da evolução de vias metabólicas**

Os modelos de evolução de vias metabólicas e metabolismo estão centrados na análise da estrutura e seqüência das enzimas, genômica e comparativa. E modelos sobre malhas metabólicas propriamente (*metabolic landscapes*) e/ou grandes estruturas do metabolismo são vagos e pouco explicativos; ou são ineficientes.

A enorme complexidade de malhas metabólicas biológicas levou à sugestão/hipótese de que estas são construídas em módulos que desempenham funções particulares e são “reusadas” ou reaproveitadas durante a evolução, de forma similar aos domínios presentes nas estruturas de proteínas, como sugerido por Spirin *et al* (2006). Estes autores ainda apontam não haver a coerência necessária/suficiente entre a estrutura modular das malhas metabólicas e sua função fisiológica que autorize, de forma consistente, a adoção de um modelo para a evolução das malhas metabólicas quando analisadas em escalas diferentes: genômica, estrutural e funcional. Apesar de muitos trabalhos terem explorado a evolução e organização de malhas metabólicas, muitos deles estudaram predominantemente tanto a escala estrutural e topológica da malha (Ouzounis e Karp, 2000) como o grau de distribuição de fluxo na malha (Wagner e Fell, 2001; Edwards, Covert e Palsson, 2002; Almaas *et al.*, 2004).

Por outro lado, muitos estudos exploraram a relação entre vias metabólicas e conservação do contexto genômico que as expressa. Trabalhos recentes mostram grande proximidade entre *clusters* de enzimas funcionalmente relacionadas (Ogata *et al.*, 2000, von Mering *et al.*, 2003, Glazko e Mushegian, 2004). Outros estudos relataram proximidade cromossômica (Snel, Bork e Huynen, 2002; Pal e Hurst 2002, Rison, Teichmann e Thornton 2004, Light e Kraulis, 2004), agrupamento em operons e coexpressão de enzimas da mesma via metabólica (Kharchenko, Vitkup e Church, 2004, Ihmels, Levy e Barkai, 2004; Snel, van Noort e Huynen, 2004; Chen e Vitkup 2006). Outros usaram essas observações para identificar enzimas que se perderam ou deixaram de ser expressas ao longo da evolução (Green e Karp, 2008) e para identificação de módulos paralelos, que são conjuntos/famílias (*sets*) de proteínas num organismo que catalisam reações bioquímicas similares, mas agem em



substratos diferentes ou usam cofatores diferentes (Li, Pelegrini e Eisenberg, 2005). Foi investigada a proximidade no genoma dos componentes da malha metabólica para predições sobre o operon e mapeá-los de acordo com a via metabólica (Zheng *et al.*, 2005). O mesmo grupo (Zheng *et al.*, 2002) usou perfis filogenéticos para detectar *clusters* de genes conservados e com isso fazer previsões sobre a função de proteínas. Também foram examinadas a evolução de complexos proteicos e sua relação com malhas metabólicas, sugerindo que não há coerência suficiente na organização modular das malhas do ponto de vista evolutivo (Snel e Huynen, 2004).

Há falta de relação desses modelos com a fisiologia dos organismos. Eles olham para a estrutura da enzima e não levam em consideração o que acontece na fisiologia do organismo. Também não têm relação com a ecologia dos organismos, desconsiderando o ambiente em que o organismo vive e as adaptações que o tornam viável nesse ambiente. Estão focados na estrutura (ou nas mudanças de estrutura) ou no papel do substrato (considerando somente as alterações de uma dada enzima). E por fim, não têm relação (ou não procuram encontrar relação) com a história evolutiva do organismo. As críticas mais contundentes são a falta de relação desses modelos com a fisiologia, ecologia e história evolutiva, pois estão focados nas enzimas estruturalmente, mas pouco funcionalmente.

### **1.3 Onde contribuir sem fazer mais do mesmo**

De acordo com o exposto anteriormente, observa-se que há possibilidade e necessidade de agregação de formas suplementares de análise das malhas metabólicas. Sem abrir mão de dados fornecidos por modelos computacionais, é possível realizar uma análise qualitativa de uma determinada malha, relacionando-a

com aspectos fisiológicos de seres vivos cujas informações estiverem disponíveis, tanto nos bancos de dados, como em outras publicações.

Com isso, é possível, através da análise de alguns pontos determinados de uma via metabólica, fazer inferências sobre as formas como estas evoluíram. De acordo com a sua colocação e relação com uma malha mais ampla onde esta via está inserida (Rutter e Zufall, 2004), considerações sobre o fato de semelhanças entre o metabolismo de organismos diferentes terem se mantido ao longo da evolução podem ser relacionadas ao modo como as malhas evoluíram.

Esta possibilidade de análise das vias metabólicas está baseada no fato de publicações recentes mostrarem que a interpretação dos dados obtidos classicamente na Bioquímica pode ser ampliada, uma vez que funções adicionais de diversas enzimas passaram a ser relatadas em situações que não estão relacionadas à via metabólica onde foram originalmente descritas (Kim e Dang, 2005). Além disso, mesmo as descrições da atividade enzimática em si têm sido reavaliadas a partir de novos dados relativos à plasticidade de sítios ativos enzimáticos (Todd *et al.*, 2002). Assim, considerações importantes quanto à forma como evoluíram as vias e malhas metabólicas podem ser feitas e novos elementos podem ser incorporados não só na análise da evolução molecular dos seres vivos (Ravasz *et al.*, 2002) como na associação com conhecimentos de genética molecular, já bem incorporados aos estudos de evolução (Lewontin, 2002).

Por haver muitos dados, dispersos e não analisados, observou-se a possibilidade de uma síntese, pinçando elementos disponíveis na literatura para a composição de um cenário evolutivo.

Na procura de uma via metabólica que servisse de modelo, também levou-se em consideração a quantidade de dados disponíveis sobre a via, a qualidade desses dados e a quantos organismos diferentes esses dados se referiam.

Algumas vias possuem muitas saídas laterais, ou são muito grandes ou ainda não são facilmente diferenciáveis de outras vias com as quais se relacionam intimamente. Havia necessidade de focalização em um ponto muito menor para que os dados fossem tratáveis sem recursos computacionais ou mesmo outras ferramentas indisponíveis no momento. Foi escolhido o nitrogênio e foi adotada uma malha de referência do metabolismo de assimilação e fixação de nitrogênio, obtida da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, 2008) (Figura 1.1). As justificativas e importância desta escolha estão destacadas nas seções seguintes.

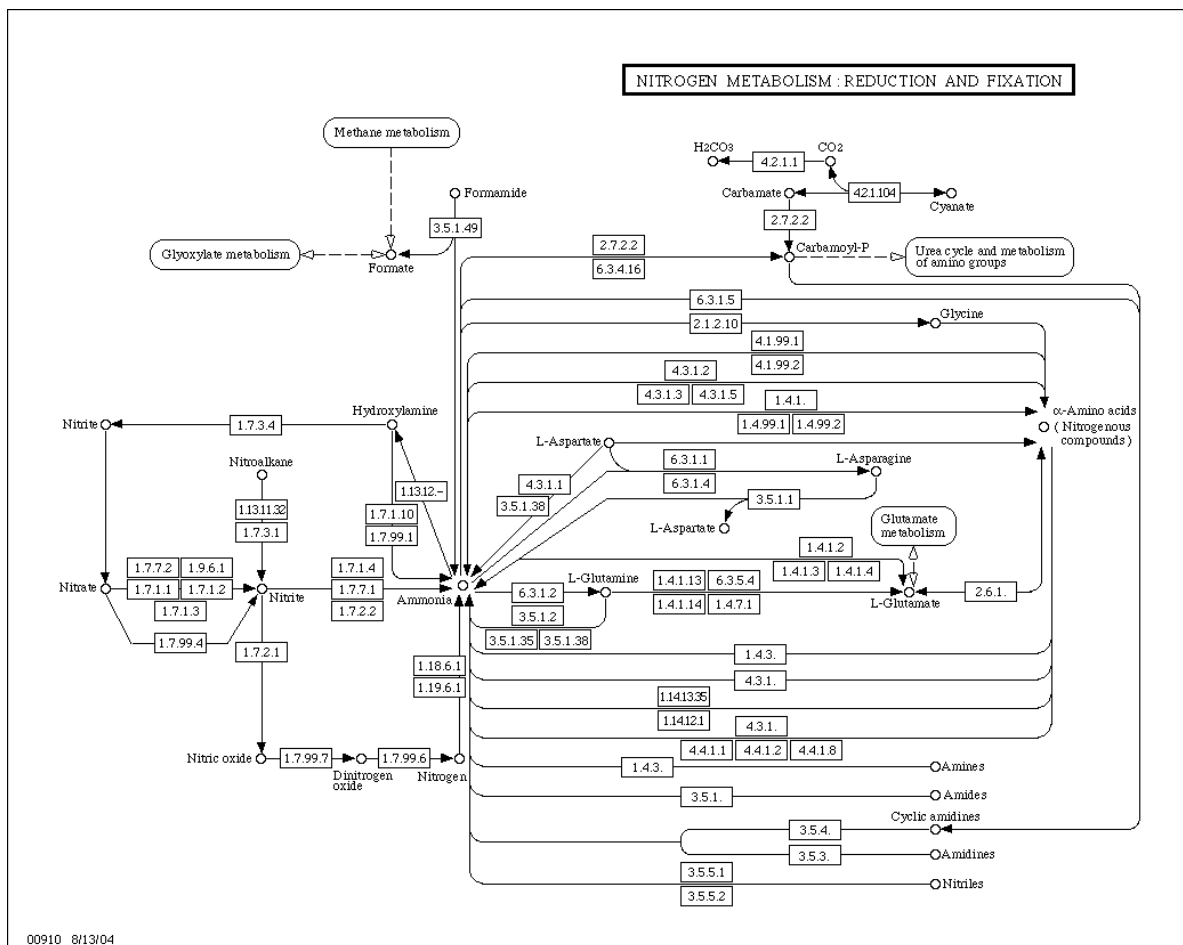


Figura 1.1. Mapa do metabolismo de redução e fixação de nitrogênio, KEGG (KEGG, 2008).

## 1.4 Justificativas da escolha

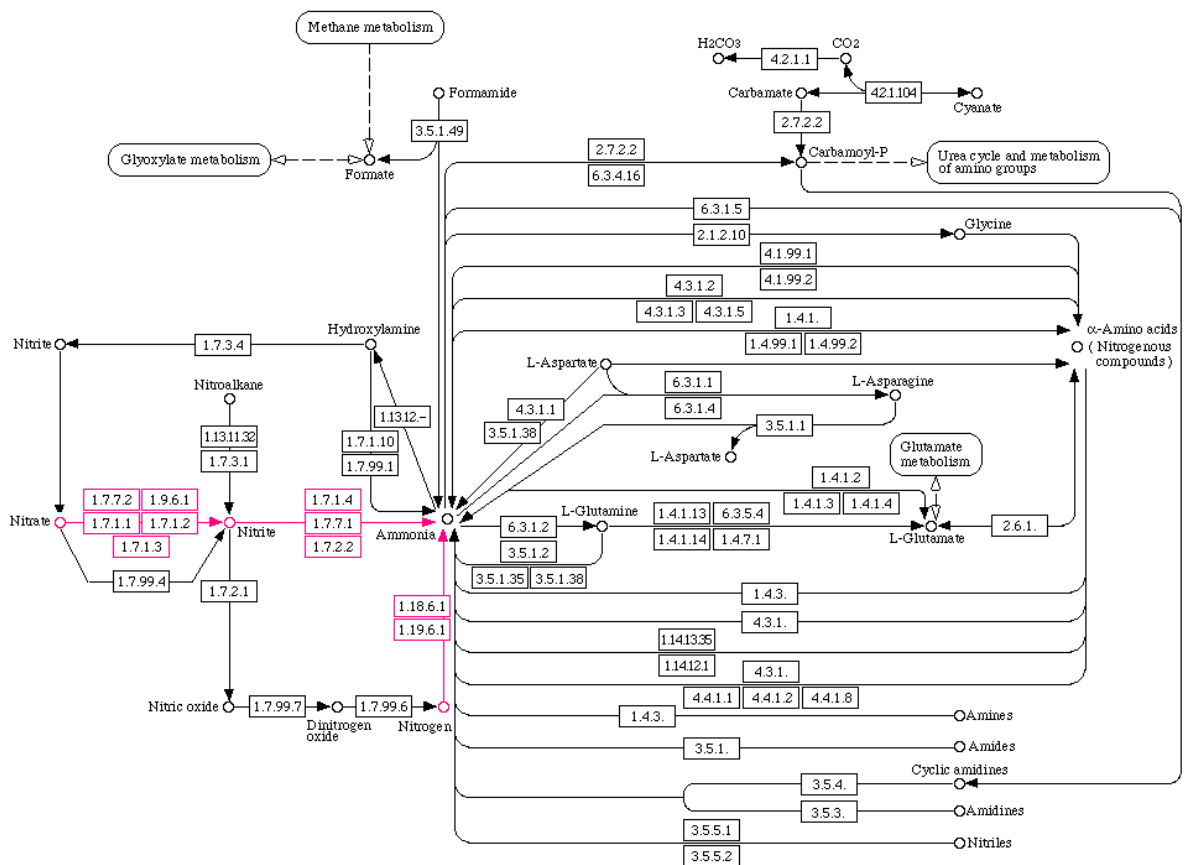
Os metazoários são incapazes de síntese líquida de  $\alpha$ -aminoácidos a partir de nitrogênio inorgânico. Os livros de bioquímica trazem classicamente a citação de que os metazoários são capazes de transferir amônio para um esqueleto carbônico que ele seja capaz de sintetizar. Daí vem o conceito de aminoácido essencial. Os aminoácidos essenciais são aqueles cujos esqueletos carbônicos o organismo é incapaz de sintetizar. Além da necessidade de consumo mínimo de aminoácidos essenciais, há ainda a necessidade de aporte adicional de nitrogênio em uma forma assimilável, ou seja,  $\alpha$ -aminoácidos, essenciais ou não essenciais (Katagiri e Nakamura, 2002). A demanda do aporte de nitrogênio e os processos enzimáticos e metabólicos envolvidos serão analisados na Seção 4.4.1.

### 1.4.1. Relação entre “injeção” e drenagem de amônio.

Precedendo as considerações sobre a aquisição de  $\alpha$ -aminoácidos é importante tratar da obtenção de nitrogênio em forma assimilável pela maioria dos organismos.

Existem essencialmente dois caminhos de fornecimento de amônio (destacadas em vermelho, na Figura 1.2): via nitratos e nitritos – pelas nitrito/nitrato redutases – e via nitrogenase (EC 1.18.6.1), a partir de nitrogênio molecular da atmosfera.

As nitrito e nitratos redutases não estão incluídas neste estudo, uma vez que estão comprometidas com a reciclagem de nitrogênio na natureza (desnitrificação e nitrificação) e não são competentes na captação de nitrogênio atmosférico, que é a única forma de incorporação quantitativa de nitrogênio adicional para aquele ciclo.



**Figura 1.2.** Destaque às vias de assimilação de nitrogênio, pela via das nitrito e nitrato redutases (EC 1.7.X.Y) e pelas nitrogenases (EC 1.18.6.1 e 1.19.6.1). Notar que essas são as únicas vias que fornecem nitrogênio para a malha; ainda mais, somente as nitrogenases fornecem nitrogênio extra para o sistema, uma vez que são as únicas que captam nitrogênio atmosférico e o convertem a formas assimiláveis para a malha.

#### 1.4.1.1. A fixação biológica de nitrogênio (FBN)

Apesar do  $N_2$  ser o gás predominante da atmosfera, nitrogênio fixado é um nutriente limitante em muitos ecossistemas terrestres. A fixação global de nitrogênio totaliza 260 milhões de toneladas/ano dos quais ecossistemas terrestres contribuem com 140 milhões de toneladas, ecossistemas marinhos 36 milhões, a indústria de fertilizantes 77 milhões e raios na atmosfera 8 milhões de toneladas (Brady e Weil, 1996).

Outros autores (Igarashi e Seefeldt, 2003) fornecem outros números: fixação de nitrogênio por raios na atmosfera ( $\sim 3 \cdot 10^{14}$  g/ano ou 1% do total), produção industrial ( $\sim 150 \cdot 10^{14}$  g/ano ou 50% do total), fixação biológica ( $\sim 150 \cdot 10^{14}$  g/ano ou 50% do total).

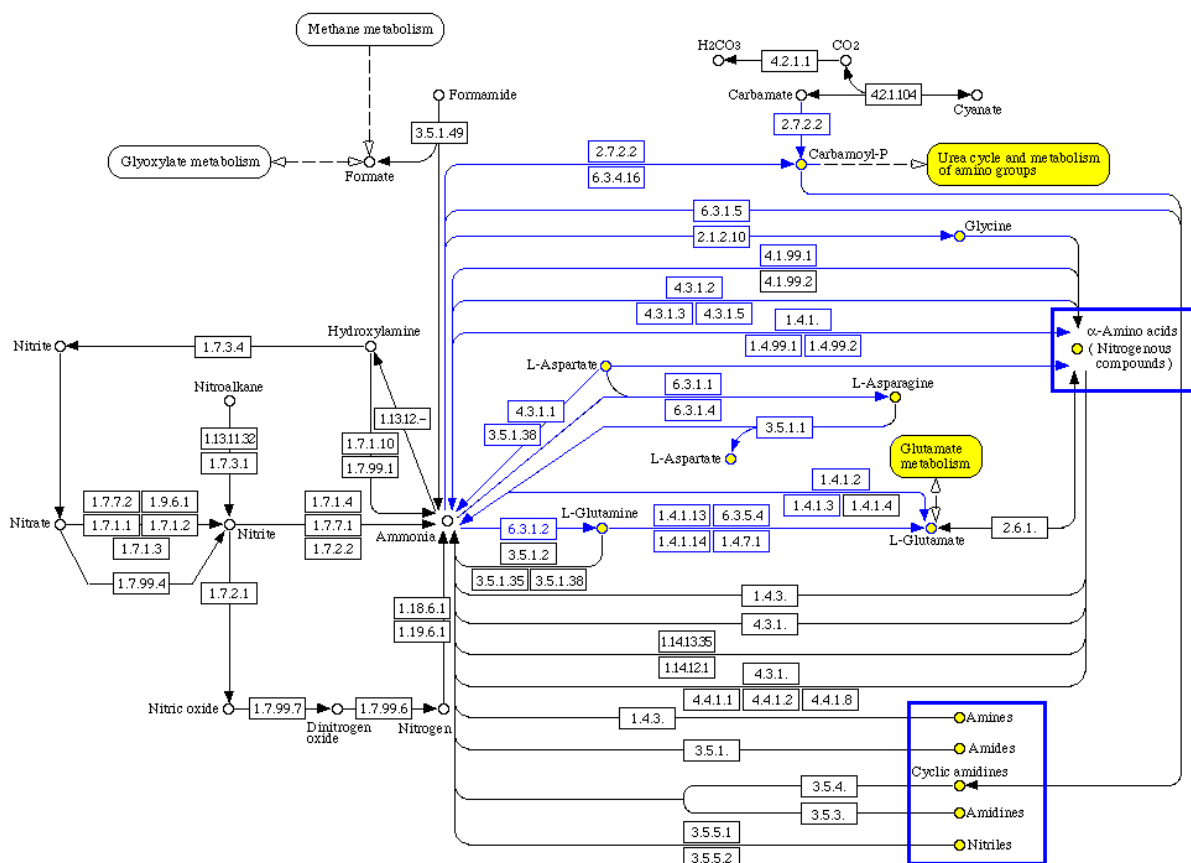
A disponibilidade de nitrogênio fixado em ambientes terrestres e marinhos influencia a produtividade de organismos fotoautotróficos e exerce grande influência nos níveis de  $\text{CO}_2$  atmosférico. Apesar de 34500 toneladas de  $\text{N}_2$  cobrirem cada acre de terra, apenas alguns procariotos possuem o complexo nitrogenase que converte esse  $\text{N}_2$  em formas de nitrogênio assimiláveis (Nardi, Mackie e Dawson, 2002). Assumia-se que algumas espécies de bactérias fossem responsáveis pela fixação de nitrogênio; seriam, entretanto, irrelevantes quantitativamente em massa, de forma que o suprimento mundial de nitrogenase mal poderia encher o bolso de uma calça (Wolfe, 2001). Esta estimativa foi revista em trabalho recente (Montagna e Torres, 2008), que será apresentado na seção 4.2.2.

Devido ao valor do pH no ambiente celular dos organismos, a amônia ( $\text{NH}_3$ ) produzida por reações enzimáticas é prontamente convertida a amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), de forma que o composto presente no meio é o íon amônio. Chama a atenção o fato de haver um aparente desequilíbrio entre as vias de fornecimento e drenagem de amônio – duas vias de formação de amônio contra um número bem maior de vias de drenagem. Note-se na Figura 1.3 que, apesar de haver um grande número de setas que partem de  $\alpha$ -aminoácidos, aminas, amidas, imidinas, nitrilas e do ciclo da uréia e chegam a amônia (destacadas nas caixas azuis), todas representam vias onde há reciclagem de  $\text{NH}_4^+$  e não há fornecimento de mais  $\text{NH}_4^+$  para o ciclo.

Apesar de haver um volume expressivo de complexos enzimáticos para o metabolismo de  $\text{NH}_3$ , eles estão comprometidos com a reciclagem de nitrogênio na

natureza (desnitrificação e nitrificação) de forma que a única via para a introdução de mais nitrogênio nessa malha (que está amplamente baseada na reciclagem de compostos chave) é a presidida pela nitrogenase – usando-se nitrogênio molecular atmosférico.

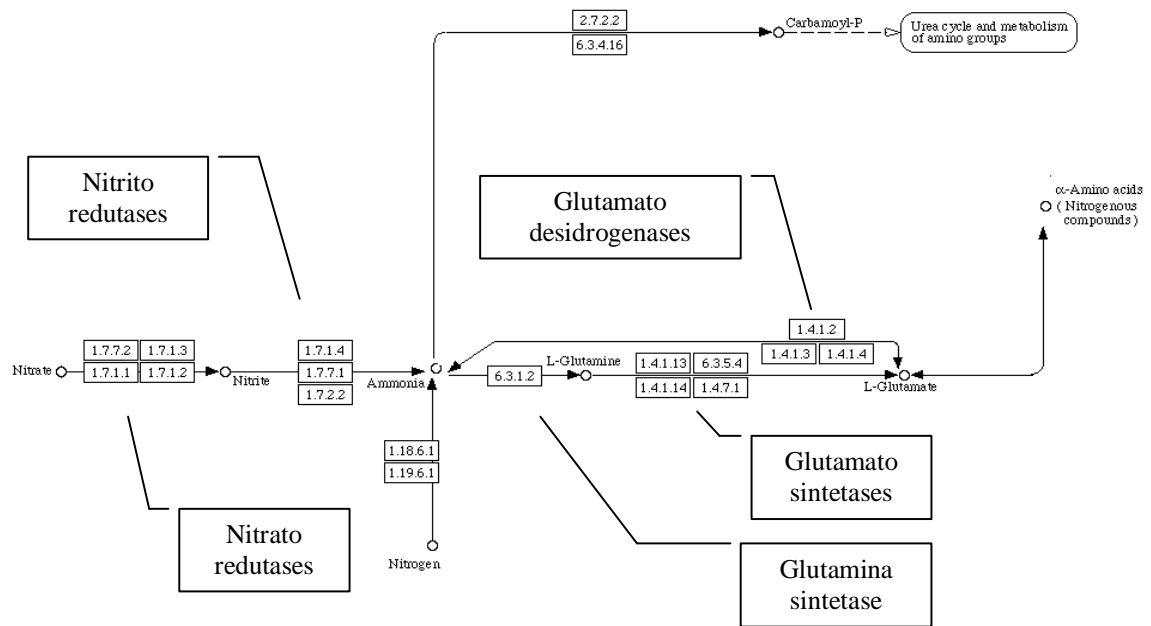
Ainda na Figura 1.3, os pontos de entrada do nitrogênio fixado (representados pelas setas azuis) nos organismos são: diretamente via glutamato desidrogenase (GDH), complexo glutamina sintetase (GS) e glutamina-oxoglutarato amino transferase (GOGAT), em bactérias e plantas, e via GDH, GS e carbamoil-fosfato sintetase em metazoários.



**Figura 1.3.** As vias em destaque são as vias que drenam amônio ou ainda que são responsáveis pelo consumo do nitrogênio fornecido. Em amarelo, destino tomado pelos compostos que são direcionados para outras malhas metabólicas. Notar que o ciclo da uréia é um fundo cego para a amônia. As caixas azuis incluem compostos nitrogenados cujo catabolismo não representa fornecimento *de novo* para o ciclo, mas a reciclagem do nitrogênio endógeno.

Assim, os caminhos investigados convergem para um foco na amônia/amônio, pois tanto as reciclagens do ciclo de desnitrificação/nitrificação mais a fixação de nitrogênio como as oriundas das vias de anabolismo/catabolismo dos organismos passam necessariamente por esse nó, esse centro de confluência da malha do metabolismo de nitrogênio.

Assim, considerando os processos relevantes para a formação de glutamato, o caminho a ser analisado é o do nitrogênio sendo convertido a amônia pela nitrogenase, a relação da amônia com a formação do glutamato e, em seguida, a formação de  $\alpha$ -aminoácidos (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Do mapa completo mostrado nas figuras anteriores foi extraído esse mapa que destaca as vias de fornecimento e drenagem direta de nitrogênio que serão tratadas neste trabalho.



Nos metazoários, o caminho é restrito à saída de amônia a partir de glutamato, e não contrário. Esta afirmação refere-se às condições *in vivo* e não à reação reversível catalisada *in vitro*. Para bactérias a interconvertibilidade (entrada e saída de amônia/amônio) é observada. Em metazoários, predominantemente saída.

Por estas razões, o metabolismo do nitrogênio constitui um bom modelo para o estudo pretendido. Ou seja, contribuir para o entendimento do processo evolutivo que levou a esse cenário: os metazoários a só podem usar  $\alpha$ -aminoácidos. É o que se pode fazer: contar a história evolutiva, uma vez que a natureza do processo evolutivo é (quase) inabordável. Aqui citamos Lorenz (1993), sobre a peculiaridade do trabalho de reconstrução de uma história evolutiva:

“Literalmente, todo detalhe característico de forma e função de todo organismo vivo é determinado pela sucessão de eventos evolutivos que produziu aquele organismo. Esta progressão histórica é determinada, sucessivamente, por um número astronômico de cadeias causais que convergem para seu curso de maneira que, em princípio, é impossível traçar este curso para trás, a não ser por um curto espaço. A rota que a evolução tomou só pode ser reconstruída em uma pequena extensão, mas não as causas que determinaram esta rota. Em suas tentativas de redução e explicação, o biólogo precisa se reconciliar com um resíduo que não pode ser racionalizado historicamente. Ele pode explicar as funções observadas no seu objeto de estudo somente por meio de suas *estruturas* (grifo nosso). Isto o força a focalizar sua atenção em tais estruturas, não somente por elas mas também por causa de suas funções.

O biólogo que tenta reduzir, extrapolar algo que já é conhecido no que se refere à vigência de suas leis, ou que tenta explicar algo que já existe por meio de novas hipóteses confronta-se com duas tarefas que, ainda que se sobreponham e se misturem, podem ser claramente diferenciadas. A primeira tarefa é uma análise da forma e da função do sistema vivo *como ele é neste momento* (grifo do autor) em relação ao tempo evolutivo. A segunda tarefa é compreender como este sistema vivo tornou-se assim e não de outra forma.

(...)

Que as duas tarefas possam ser cumpridas para o exame de um sistema vivo isso é confirmado pelo fato de que as análises do sistema vivo como ele é no momento já eram consideravelmente avançadas quando perguntas sobre como ele ficou assim ainda nem tinham sido feitas. Harvey compreendeu claramente a função do sistema circulatório e conseqüentemente postulou a existência de capilares, que naquela época ninguém ainda podia ver. Uma série inteira de descobertas, feitas independentemente de qualquer consideração histórica da gênese orgânica, é uma parte do passado da ciência médica.

Por muito tempo, muito antes que as causas principais de toda adaptação (variação genética e seleção natural) fossem descobertas, aqueles que trabalhavam com sistemas vivos estavam cientes de que suas estruturas eram constituídas de, em geral e de maneira mais especial e improvável, para sustentar a vida do indivíduo, sua prole, e conseqüentemente, sua espécie.”

Apesar de haver um natural caráter especulativo na nossa proposta de história evolutiva, ela baseia-se em fundamentos bioquímicos e evolutivos. Em Smith (Smith e Szathmáry, 1997) encontramos mais argumentos que reforçam a plausibilidade dos esforços no presente trabalho e dão mais firmeza sobre o porquê se fez o que se fez e por que isso não é uma fábula científica:

“Although this book is speculative, however, we think that it is a contribution to science, and not to fantasy. Speculation is constrained in two ways. First, each event must be explained in a way that is consistent with a general theory of evolutionary change, the evolution by natural selection. Second, an adequate account of the origin of any system must explain the peculiarities of that system that exists today. (...) In other words, theories about origins can be tested by looking at the present.

(...)

There are obvious difficulties in discussing unique events that happened a long time ago. How can we ever know that our suggested explanations are correct? After all,

historians cannot agree about the causes of the IWW. We accept that certainty is impossible, but there are several reasons why we think the enterprise worth while. First, we have one great advantage over historians: we have agreed theories both of chemistry and of the mechanism of evolutionary change. We can therefore insist that our explanations be plausible both chemically, and in terms of natural selection. This places a severe constraint on possible theories. Indeed, the difficulty lies, not in choosing between rival theories, but in finding any theory that is chemically and selectively plausible. Further, theories are often testable by looking at existing organisms.

A second reason why the study of the origins is worth while is that, to understand the origin of some structure, one must first understand what is essential about it – what features it must have if it is to work at all.”

## 2. Objetivos

O presente trabalho procura traçar uma história evolutiva coerente que possa iluminar a trajetória do uso de nitrogênio pelos metazoários para a forma como se encontra atualmente, partindo do estudo das malhas metabólicas atuais desses organismos, tomadas como referência e atualmente aceitas como tal.

Na outra extremidade da história evolutiva, procurou-se buscar dados nas origens do uso do nitrogênio e no metabolismo necessário para isso nos organismos anteriores aos metazoários e como essas características influenciaram ou ainda foram determinantes para que os organismos que evoluíram posteriormente tivessem o padrão de uso de nitrogênio observado atualmente na natureza.

Para tanto, o presente trabalho procura estabelecer a relação entre a história evolutiva dos organismos direta ou indiretamente (ou, talvez melhor, *potencialmente*) envolvidos, e a associação entre caracteres ecológicos e fisiológicos, relacionando-os com os pontos da malha metabólica em que havia influência determinante para os eventos de seleção natural (evolutivos) que foram a *driving force* do processo, bem como as conseqüências das alterações fisiológicas/ambientais.

Para investigar a história evolutiva do uso de nitrogênio e sua relação com a disponibilidade dos compostos nitrogenados, nós integramos:

1. a malha metabólica de referência com a fisiologia e metabolismo da fixação do nitrogênio atmosférico;

2. a história evolutiva desse caráter no contexto geológico da atmosfera terrestre desde seu surgimento, passando pelas transições da composição dessa atmosfera;

3. o impacto dessa transição nos organismos e o componente da pressão seletiva que redimensionou a função desse aparato de fixação de nitrogênio, bem como sua redistribuição ecológica;

4. o impacto da ecologia dos diazótrofos e sua relação com os organismos que surgiram/evoluíram posteriormente a esses organismos sob o ponto de vista da interação fisiológica/metabólica entre os diazótrofos e organismos incompetentes/dependentes de compostos nitrogenados oriundos destes.

5. Procurou-se traçar a origem evolutiva do uso de  $\alpha$ -aminoácidos como fonte de nitrogênio assimilável em metazoários.

6. Finalmente, tendo em mãos a sistematização, concatenação e reestruturação desses pontos anteriores, propor uma hipótese ou história evolutiva para a origem do uso de  $\alpha$ -aminoácidos como a única fonte de nitrogênio assimilável para metazoários que seja coerente com os dados coletados e com o panorama fisiológico e ecológico observado atualmente nas espécies analisadas e avaliadas disponíveis na literatura especializada.

Dessas considerações espera-se responder uma pergunta clara do projeto: como os metazoários, evolutivamente, ficaram restritos ao uso de  $\alpha$ -aminoácidos como fonte de nitrogênio?

### 3. Procedimentos

A consulta à literatura consistiu não de um levantamento, mas da organização e sistematização de dados dispersos, articulando-os para montar uma coerência que levasse à proposição de um modelo evolutivo.

Investigou-se a relação existente entre dados dispersos, procurando a linha condutora da história evolutiva que se pretende traçar. É como montar um quebra-cabeça com as peças obtidas dos dados do KEGG.

Para propor uma forma de análise da evolução dessas malhas foi realizado um levantamento na literatura e periódicos especializados bem como nos bancos de dados *online*, nas versões correntes do KEGG (Kanehisa e Goto, 2000 e Kanehisa *et al.*, 2002) e BRENDA (Schomburg *et al.*, 2002), disponíveis na rede.

A pesquisa teve seu foco na assimilação de nitrogênio, orgânico ( $\alpha$ -aminoácidos) ou inorgânico (amônio), e as enzimas envolvidas nesse processo e teve como o nó central da malha o amônio, como produto final da fixação do nitrogênio atmosférico e como substrato de entrada nas vias de assimilação de nitrogênio. As vias de produção de amônio selecionadas foram o complexo nitrogenase (EC 1.18.6.1), envolvido diretamente na fixação de  $N_2$ . Como vias de entrada na assimilação desses compostos nitrogenados, foram enfocadas em primeiro lugar as glutamato desidrogenases (GDH), procarióticas (EC 1.4.1.4) e eucarióticas (EC 1.4.1.3). O complexo glutamina sintetase – glutamina: oxoglutarato glutamato amida transferase (GS-GOGAT) [Glutamina sintetase (GS – EC 6.3.1.2) e glutamina-oxoglutarato glutamato amida transferase (GOGAT – EC 1.4.1.13, 1.4.1.14)], será apenas considerado em determinados pontos da nossa análise e sua história evolutiva não foi contemplada no presente trabalho.

As citações foram agrupadas pelo habitat dos organismos, enfatizando os mais extremos e outros que não estejam restritos à rizosfera, com foco em habitats que ainda não haviam sido descritos na literatura clássica. Para cada caso, tentou-se rastrear as primeiras citações do assunto.

Todos os dados são provenientes de publicações e situações experimentais independentes, com abordagens de medição de atividade de nitrogenase e/ou sua expressão. A simples constatação/presença de seqüências similares às nitrogenases reconhecidas no genoma bacteriano não foi considerada, uma vez que não garantia a expressão desse gene/grupo de genes em condições fisiológicas.

Por outro lado, organismos que provaram ser capazes de realizar fixação de nitrogênio *in vitro* foram incluídos, mesmo que essa não seja uma indicação definitiva de que eles mantenham/possuam essa capacidade em condições ambientais.

## 4. Resultados

A organização e apresentação dos dados obtidos não seguirão uma forma ortodoxa por inexequibilidade, dado o grande volume de informação e a natureza dessa informação. Como mencionado anteriormente (seção “Procedimentos”), cada item aqui apresentado esquematicamente é fruto de extensa revisão e sistematização de dados provenientes de diversas fontes da literatura. A reinterpretção dos dados disponíveis só é possível e faz sentido por meio do discurso e não por meio da apresentação direta dos dados gerados por outros autores. Os dados utilizados muitas vezes foram obtidos com outros propósitos (cinéticos, por exemplo) e as conclusões a que chegam os autores são mais relevantes do que os dados em si. Além disso, havia a necessidade de criação de uma coerência entre esses dados/conclusões com o novo contexto/âmbito em que eles são inseridos – o da história evolutiva aqui proposta – e, portanto, tratado de forma diferente do seu contexto original, justamente por requerer uma abordagem interpretativa em outro contexto. Sendo assim, é apresentado a seguir o esquema geral da conclusão do trabalho, os tópicos centrais de cada ponto elaborado e sistematizado que compõem a história evolutiva proposta, e na seção seguinte (“Discussão”), cada um desses tópicos será amplamente discutido, donde se poderá depreender os dados coletados, seu rearranjo, sistematização e onde esperamos que fique clara a (muitas vezes) impossibilidade de apresentação de dados brutos, ou simplesmente de “dados” (como se faz rotineiramente) aqui manifesta.

Podemos então categorizar os eventos propostos em duas classes majoritárias, ainda que não estanques:



1. A apresentação de um cenário ambiental que inclui o panorama biológico instalado e a relação dos organismos com o ambiente na situação descrita, e;

2. A transição ou evento que altere as características desse ambiente/cenário, configurando assim o elemento de pressão seletiva que seja compatível com as mudanças ecológicas/fisiológicas/biológicas observáveis subsequente, e que sejam compatíveis com os cenários admitidos na literatura e que, portanto, dão a consistência/coerência necessária ao que se propõe no presente trabalho.

É apresentado a seguir (Figura 4.1) um diagrama que sintetiza a proposta de história evolutiva, onde estão separados por cores os grandes núcleos de eventos. Deve-se ressaltar a impossibilidade de separação absoluta ou corte abrupto dos assuntos uma vez que eles representam um contínuo. Apesar do artificialismo de tal de separação, é apropriado setorizar ou agrupar os assuntos dentro de um âmbito de maior coerência temática, que estão listados a seguir.

1. Origem e evolução das nitrogenases: as condições atmosféricas.

2. Mudança do papel fisiológico das nitrogenases e conseqüências ecológicas.

3. Produto final das nitrogenases *in vivo*.

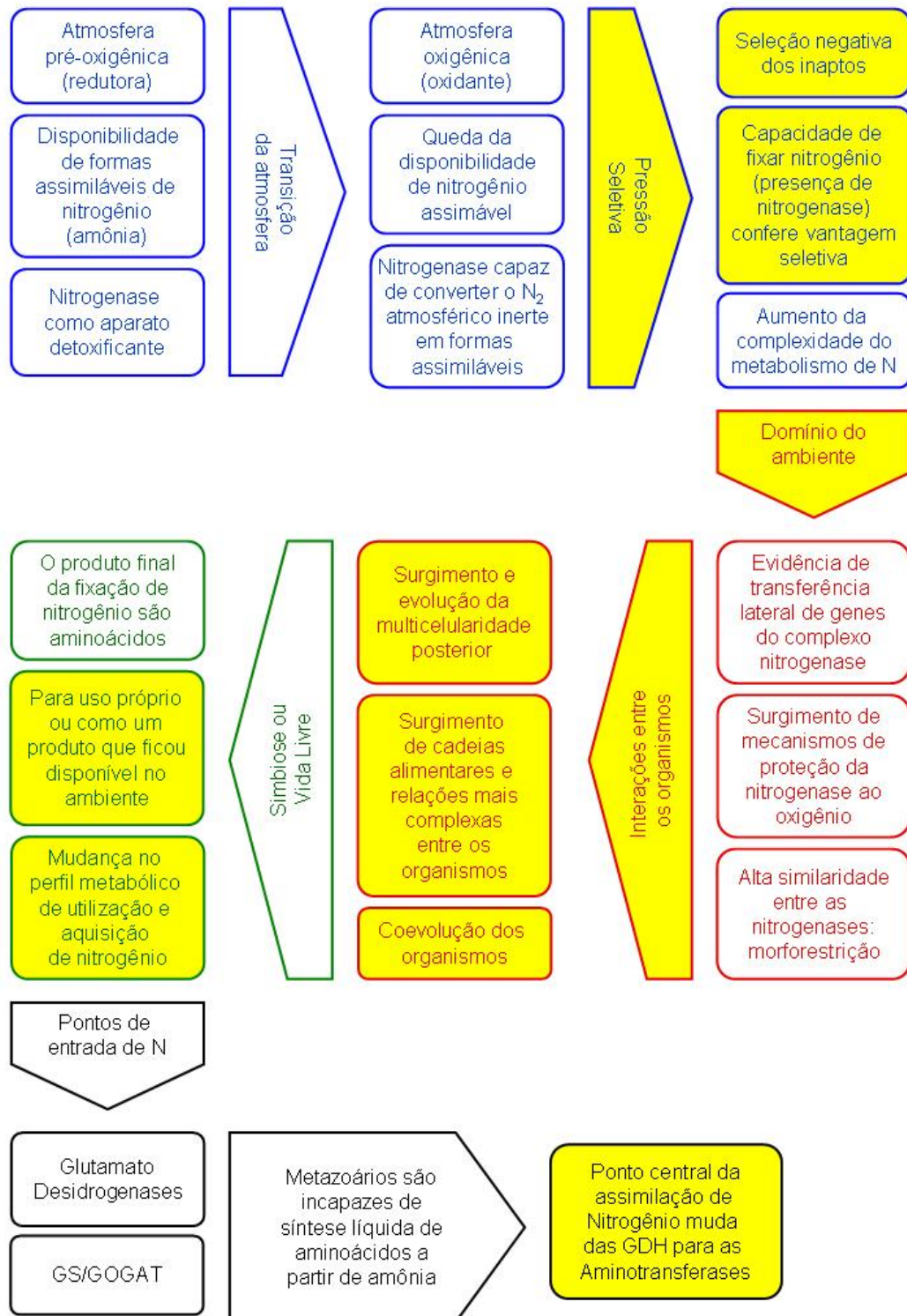
4. A captação de nitrogênio pelos metazoários.

Com o intuito de sintetizar e agrupar todos os dados de forma direta e prontamente depreensível, a história evolutiva proposta para o uso do nitrogênio por metazoários está apresentada na figura 4.1 e os trechos relativos à nossa divisão temática, nas figuras 4.2 a 4.5.

Duas observações sobre a figura 4.1.

a. As cores setorizam os eventos nas seções citadas acima.

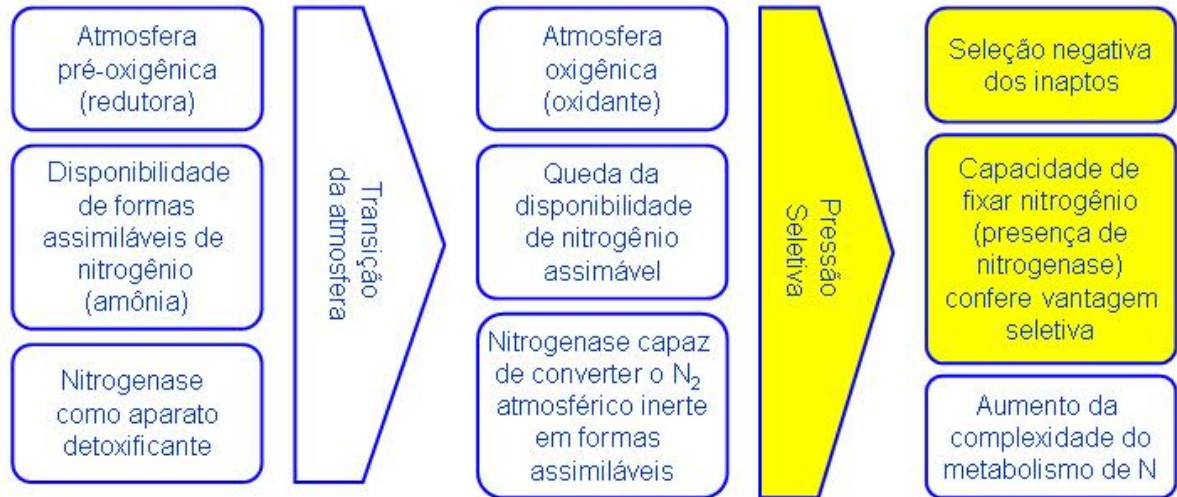
b. As caixas em destaque referem-se aos dados obtidos no presente trabalho, seja a reinterpretção de dados já existentes ou a elaboração de interpretações/induçãoes coerentes com os dados coletados.



**Figura 4.1** – História evolutiva proposta para o uso de nitrogênio por metazoários. As caixas destacadas em amarelo são dados gerados no presente trabalho.

#### 4.1. Origem e evolução das nitrogenases: a questão das condições

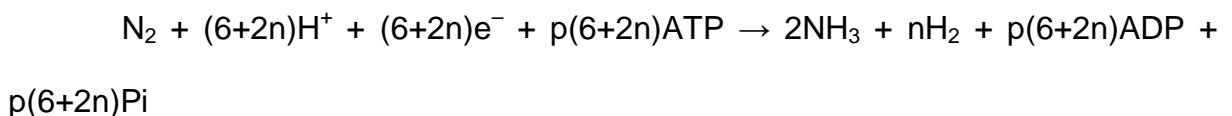
##### atmosféricas



**Figura 4.2.** Função metabólica das nitrogenases nas condições atmosféricas pré-oxigênica e oxigênica e as conseqüências da transição atmosférica para os organismos.

##### 4.1.1. Nitrogenase

Fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo de conversão do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) para sua forma reduzida (NH<sub>3</sub>). A enzima responsável pela conversão é a nitrogenase (EC 1.18.2.1.), que está presente em Eubactérias, Archaea e alguns actinomicetos. A fixação de nitrogênio é um processo com alto custo energético para a célula/organismo, que requer grandes quantidades tanto de poder redutor (NADPH) como de ligações fosfato de alta energia (ATP):



No modelo padrão discutido em uma revisão recente (Rees e Howard, 2000), e atualmente aceito, a formação de uma molécula de diidrogênio está acoplada à redução de uma molécula de dinitrogênio, e duas moléculas de ATP são hidrolisadas por elétron transferido, assim n=1 e p=2. Entretanto, ainda não há uma

demonstração clara de um acoplamento mecanístico obrigatório entre a produção de diidrogênio e a redução de dinitrogênio, apesar de o diidrogênio sempre ser observado como produto juntamente com a amônia; e ainda, há uma proporção estequiométrica limitante de duas amônias para cada diidrogênio obtido em altas pressões parciais de gás nitrogênio (Simpson e Burris, 1984). Pelo fato da nitrogenase também ser capaz de reduzir prótons a diidrogênio na ausência de dinitrogênio, a estequiometria observada nos produtos pode estar relacionada a processos de vias distintas mas que ocorrem paralelamente no processo de transferência de elétrons.

A redução obrigatória de próton ocorre na catálise, com o mínimo de 1 mol de H<sub>2</sub> produzido por mol de N<sub>2</sub> reduzido. A proporção de elétrons alocados por próton aumenta em condições de limitação de fluxo de prótons, aumentando o consumo de ATP (Burgess e Lowe, 1996).

A nitrogenase também é capaz de reduzir muitos outros substratos alternativos que sejam similares a N<sub>2</sub>, ou ainda que tenham duplas ou triplas ligações em sua estrutura. O acetileno é muito utilizado na pesquisa das nitrogenases, pois o produto da reação é o etileno, facilmente quantificável por cromatografia a gás. Uma vez que acetileno e etileno atravessam o envelope bacteriano, a atividade nitrogenásica pode ser medida tanto *in vivo* como *in vitro* pelo método de redução do acetileno (Dean e Jacobsen, 1992).

#### 4.1.2. Estrutura

O complexo nitrogenase consiste de duas metaloproteínas, que são muito conservadas em seqüência e estrutura nos diazotrofos (Hanson *et al.* 2004). O sítio de redução do substrato é uma ferro-molibdeno proteína (MoFe)<sup>4</sup>, a dinitrogenase,

que é um tetrâmero de 230 kDa composto por duas subunidades ( $\alpha_2\beta_2$ ); essas subunidades são produto dos genes *nifD* e *nifK*. O doador obrigatório de elétrons para a proteína MoFe é a proteína ferro-enxofre-nitrogenase [4Fe:4S], a dinitrogenase redutase, que é composta de duas subunidades idênticas codificadas pelo gene *nifH*. Os genes que codificam as proteínas MoFe e [4Fe:4S], assim como os genes acessórios que codificam as proteínas carreadoras de elétrons, da síntese do *metalocluster* e da regulação compõem o regulon *nif* (Howard e Rees, 1996).

Além do regulon *nifHDK*, outros operons que codificam complexos de fixação de nitrogênio foram identificados na cianobactéria heterocística *Nostoc* sp., linhagem/cepa PCC 7120 (Haselkorn e Buikema, 1992). Estão incluídos *nifBSU*, *fdxN* e *nifENXW*. *NifB*, *nifN* e *nifE* estão envolvidas na síntese do cofactor MoFe. *FdxN* codifica a ferredoxina bacteriana de função desconhecida assim como *nifS*, *nifU*, *nifX* e *nifW* (Haselkorn e Buikema, 1992). Estudos recentes sugerem que alguns genes *nif* surgiram por duplicação gênica em paralelo (*parallel gene duplication*) (Fani, Gallo e Liò, 2000). Além dessas nitrogenases, outras ainda foram descritas: *nif2* Mo-dependente, *vnf* Va-dependente e operons *anf* Fe-dependentes (Bishop e Premaktur, 1992).

Os operons cujos produtos já foram identificados revelam cada vez mais a complexidade estrutural do sistema de fixação e, ainda mais, a complexidade da regulação necessária para a orquestração desse sistema com outras partes do metabolismo. Para ilustrar a complexidade desse sistema, estão listadas nas tabelas 4.1 e 4.2 os produtos gênicos conhecidos dos operons *nif* e *vnf*.

Gene	Identificação ou produto do gene
<i>nifH</i>	Fe-proteína. Doador obrigatório de elétrons para a MoFe proteína durante o ciclo de catálise da nitrogenase. <i>NifH</i> também é requerido para a síntese do cofator FeMo e maturação da apo-MoFe proteína.
<i>nifD</i>	Subunidade da proteína MoFe. Forma um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ com a subunidade $\beta$ da proteína MoFe. O sítio de redução do substrato, FeMo-co, está ligado à subunidade $\alpha$ da proteína MoFe.
<i>nifK</i>	Subunidade da proteína MoFe. P-clusters estão presentes em cada interface das subunidades $\alpha\beta$ .
<i>nifY/naY</i>	Chaperona para a apo-MoFe. <i>NaY</i> também é um carreador de FeMo-co e se propõe que seja responsável pela inserção do FeMo-co na proteína apo-MoFe.
<i>nifU</i>	Scaffold molecular para a formação do cluster Fe-S para os componentes da nitrogenases.
<i>nifE</i>	Forma um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ com NifN. Necessário para a síntese do FeMo-co.
<i>nifN</i>	Requerido para a síntese do FeMo-co. Forma um tetrâmero com NifE.
<i>nifX</i>	Envolvido na síntese do FeMo-co. Acumula um precursor biossintético do cofator.
<i>nifT</i>	Desconhecida
<i>nifS</i>	Envolvido na mobilização de S para a síntese e reparo do cluster Fe-S.
<i>nifV</i>	Homocitrato sintase envolvida na síntese do FeMo-co.
<i>nifW</i>	Envolvido na estabilidade da proteína MoFe.
<i>nifZ</i>	Desconhecido
<i>nifM</i>	Requerido para a maturação de NifH.
<i>nifF</i>	Flavodoxina. Doador fisiológico de elétrons para NifH em <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
<i>nifL</i>	Regulador negativo
<i>nifA</i>	Regulador positivo
<i>nifB</i>	Requerido para a síntese do FeMo-co. Seu produto metabólico, NifB-co, é um doador específico de Fe e S para o FeMo-co.
<i>fdxN</i>	Ferredoxina. Em <i>Rhodospirillum capsulatus</i> funciona como doador de elétrons para a nitrogenase.
<i>nifQ</i>	Envolvido na síntese do FeMo-co. Admite-se que seja responsável pelo processamento do $\text{MoO}_4^{2-}$ inicial.
<i>nifJ</i>	Piruvato:flavodoxina (ferredoxina) oxidoreductase. Doador de elétrons para a proteína Fe em <i>K. pneumoniae</i> .

**Tabela 4.1.** Produtos do gene *nif* e sua função (conhecida ou proposta) na fixação do nitrogênio. Extraído de Rubio e Ludden, 2005.

A complexidade dessa orquestração ficará mais evidente quando for mostrada a relação entre o produto *in vivo* das nitrogenases no microambiente celular e o aparato que direciona o fluxo metabólico desses produtos (seção 4.3).

Gene	Função do gene ou do seu produto
<i>vnfA</i>	Elemento regulatório positivo
<i>vnfE</i>	Proposto como elemento da biossíntese do FeV-co, análogo ao NifE
<i>vnfN</i>	Proposto como elemento da biossíntese do FeV-co, análogo ao NifN
<i>vnfD</i>	Subunidade $\alpha$ da proteína VFe
<i>vnfD</i>	Proteína Ferredoxina-like. Doador de elétron putativo ao VnfH.
<i>vnfK</i>	Subunidade $\beta$ da proteína VFe.
<i>vnfY</i>	Envolvido na biossíntese ou inserção do FeY-co.
<i>vnfX</i>	Envolvido na biossíntese do FeV-co. Acumula um precursor FeSV para o FeV-co
<i>vnfH</i>	Proteína Vnf-Fe. Doador obrigatório de elétrons para a proteína FeV e também envolvido na biossíntese do FeV-co.
<i>vnfG</i>	Subunidade $\delta$ da VFe proteína madura. Possivelmente envolvido na inserção do FeC-co na apo-VFe proteína.

**Tabela 4.2** Produtos do gene *vnf* e sua função (conhecida ou proposta) na fixação do nitrogênio. Extraído de Rubio e Ludden, 2005.

A atividade da nitrogenase em *Rhodospirillum rubrum* é regulada pela dinitrogenase redutase glicohidrolase (DRAG) e dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase (DRAT). Quando um aumento na concentração de nitrogênio fixado ou uma depleção energética é captada/sentida pela célula, a DRAG é inativada e a DRAT é ativada. Foi proposto que essa regulação é feita por uma proteína amônio-sensível (Wang e Norén, 2006).

O gene codificador do transportador de vanádio em *Anabaena* está muito próximo do *cluster* que expressa a nitrogenase vanádio-dependente (V-nitrogenase) (Pratte e Thiel, 2006); dados do mesmo trabalho sugerem que essa é uma nitrogenase alternativa para esse organismo e que a expressão da V-nitrogenase está atrelada à expressão do transportador.

O elemento de transição molibdênio (Mo) é essencial para muitos sistemas biológicos uma vez que é requerido por muitas enzimas essenciais no metabolismo global e do ciclo do carbono, enxofre e nitrogênio. O metal é biologicamente inativo a não ser que esteja complexado e formando um cofator (Moco). Com exceção das nitrogenases bacterianas, onde o Mo é constituinte de um cofator FeMo (FeMoco), o Mo está ligado a uma pterina que formará o Mo cofator (Moco) componente ativo do sítio catalítico de todas as outras as Mo-enzimas. Em eucariotos, as enzimas que contêm Mo destacáveis são (1) sulfito oxidase, que catalisa a etapa final na degradação de aminoácidos que contêm enxofre e está envolvida na detoxificação de sulfito em excesso, (2) xantina desidrogenase, que está envolvida no catabolismo de purina e produção de oxigênio reativo, (3) aldeído oxidase, que oxida vários aldeídos e é essencial para a biossíntese ácido absísico (um fitormônio), e em organismos autotróficos também (4) nitrato redutase, que catalisa um passo fundamental na assimilação de nitrogênio. Todas as molibdoenzimas, exceto a sulfito oxidase de plantas, necessitam de pelo menos mais um centro redox ativo, muitos deles envolvendo ferro na transferência de elétrons. A biossíntese de Moco envolve a complexa interação de seis proteínas e é um processo de quatro etapas que também inclui ferro e cobre de forma indispensável. O Moco assim que liberado após a síntese é distribuído para apoproteínas de Mo-enzimas por proteínas carreadoras de Mo putativas. Xantina desidrogenase e aldeído oxidase, mas não sulfito oxidase e nitrato redutase, requerem sulfuração pós-translacional do sítio Mo para se tornarem ativas. Este passo final de maturação é catalisado por uma Moco-sulfurase, que mobiliza enxofre/sulfeto de L-cisteína por uma via piridoxal-fosfato dependente típica para cisteína dessulfurases (Mendel e Bittner, 2006).



#### 4.1.3. Função fisiológica e ecológica

As transformações bioquímicas de nitrogênio têm grande influência sobre a produtividade biológica na Terra. As vias do ciclo do nitrogênio (nitrificação, desnitrificação, amonificação e fixação de nitrogênio) formam uma rede de reações redox catalisadas por grupos específicos de microorganismos. A FBN é essencial para a manutenção dos ecossistemas por disponibilizar nitrogênio assimilável a partir de  $N_2$  atmosférico, inacessível para muitos procariotos e todos os eucariotos (Steward *et al.*, 2004).

Um ponto a ser ressaltado aqui é a presença de dois grandes ciclos de reciclagens de nitrogênio. O primeiro (à esquerda do mapa apresentado na Figura 4.1) refere-se ao ciclo de desnitrificação e nitrificação no ambiente. É levado a cabo por bactérias bem estudadas e conhecidas. O nitrogênio cicla na forma inorgânica. O outro (à direita do mapa) ocorre nos organismos, quando amônia é ligada a um esqueleto carbônico e faz parte de muitos compostos, como mostrado no mapa. Esse nitrogênio, agora em uma molécula mais complexa, é reciclado de muitas formas até ser eliminado do organismo e passar a ciclar na parte inorgânica. Sendo assim, o aporte de nitrogênio é em parte mantido pelas reciclagens. A injeção de mais amônia/amônio nesse ciclo ocorre pela fixação de nitrogênio atmosférico, e as nitrogenases são o aparato enzimático que levam a cabo tal aporte.

Outro dado importante é a alta similaridade estrutural, funcional e de seqüência das nitrogenases. Young (2005) faz uma extensa revisão sobre o assunto e afirma que as nitrogenases dos organismos fixadores de nitrogênio são tão similares que elas são claramente derivadas de um ancestral comum. Postgate (1982) desafiou esse ponto de vista e afirma que as nitrogenases surgiram mais recentemente, e se disseminaram por transferência lateral de genes como melhor

explicação para a configuração atual da distribuição dessas enzimas nos organismos. Conforme as seqüências moleculares foram sendo disponibilizadas, alguns autores buscaram dar suporte para uma filogenia da nitrogenase que fosse compatível com a dos genes ribossomais e fosse consistente com a hipótese do ancestral comum (Hennecke *et al.* 1985), enquanto outros encontraram evidência de transferência lateral de genes (Normand e Bousquet, 1989). Mesmo levando em consideração as limitações de então, os dados poderiam ser admitidos como consistentes com o ancestral comum e múltiplas perdas subseqüentes dos genes, com múltiplas transferências laterais ou com uma combinação dos dois processos (ou possibilidades) (Young, 1992). Com o aparecimento de mais seqüências dos genes de nitrogenases posteriormente, tanto de novos genes como de novos diazótrofos, novos grupos homólogos da nitrogenase foram descobertos e a rede de relações cresceu de forma mais estreita – apesar da transferência lateral de genes ter ocorrido, existem poucos exemplos indiscutíveis, e assim, ainda não há consenso e completa compreensão da história evolutiva das nitrogenases (Young, 2005).

Existem algumas famílias de nitrogenases; mudam alguns cofatores (Fe, Mo-Fe, Vanádio), mas elas têm uma similaridade bastante alta – e mesmo havendo diferenças, catalisam a mesma reação química, a transformação de  $N_2$  em  $NH_3$ . Apesar de haver nitrogenases com outros cofatores metálicos, o Molibdênio é o mais comumente encontrado. É notável que a disponibilidade dos metais nas diferentes condições atmosféricas também pode ter sido um fator determinante para a evolução das nitrogenases, e metaloenzimas de uma forma geral (Falkowski e Raven, 1997).

Entretanto, o que merece destaque é a complexidade do processo de incorporação do molibdênio, que requer um aparato enzimático e uma organização

do metabolismo que não é simples e nem pode ser tratada como um mecanismo fortuito. Assim, nas considerações sobre a transferência lateral de genes (Seção 4.2.1) que disseminou as nitrogenases, também deve ser incluído todo o aparato acessório que viabiliza um complexo nitrogenase funcional e viável.

Outra questão interessante é a da disponibilidade de nitrogênio assimilável na atmosfera pré-oxigênica. Admite-se que as nitrogenases existam desde antes do aparecimento de oxigênio na atmosfera. Nessa atmosfera fortemente redutora, havia muito nitrogênio na forma de  $\text{NH}_3$ , portanto diretamente assimilável pelos organismos existentes então (somente procariotos).

Num dado momento, com o surgimento da fotossíntese tal como a entendemos hoje (a oxidação da água, em lugar da oxidação de  $\text{H}_2\text{S}$  existente na atmosfera primitiva), começa a aparecer gás oxigênio nessa atmosfera, com a subsequente mudança das condições físico-químicas. A mudança das condições atmosféricas implica numa diminuição das concentrações de  $\text{NH}_3$  por razões químicas. Esse nitrogênio passa para a forma de nitritos e nitratos e uma parte importante, para a forma de  $\text{N}_2$ . Sendo assim, a disponibilidade, antes imediata e abundante de  $\text{NH}_3$ , agora começa a diminuir. Obviamente a transição não é abrupta, mas é suficiente para causar dois problemas: (1) o oxigênio desativa irreversivelmente as nitrogenases e (2) os organismos que não têm um aparato para obtenção de amônia ou nitrogênio numa forma utilizável pelo seu metabolismo correm o risco de serem negativamente selecionados.

#### *4.1.4. Origem e evolução das nitrogenases*

Na condição anterior, de alta concentração de  $\text{NH}_3$ , numa atmosfera redutora, admite-se que as nitrogenases eram um aparato destoxicante. A

atmosfera era muito rica em etileno, acetileno, cianeto e outros compostos potencialmente tóxicos às células/organismos, pelo fato de terem na sua estrutura ligações duplas ou triplas. Compostos dessa natureza são danosos para muitas estruturas celulares como membranas e para mecanismos como a cascata de elétrons (inibida por cianeto). Assim, a nitrogenase passa de um aparato destoxicante numa condição atmosférica, para um aparato competente para metabolizar a forma estável de nitrogênio atmosférico. Ela vai passar a ter como substrato o nitrogênio molecular, convertendo-o a  $\text{NH}_3$ . Ou seja, convertendo a forma de inerte numa forma assimilável, antes abundante.

As primeiras sugestões da relação entre a função da nitrogenase e as características físico-químicas da atmosfera pré-oxigênica foram discutidas com base nos registros geológicos e paleontológicos. Também foi considerada a necessidade fisiológica da nitrogenase no ambiente primitivo e esta como um marcador biológico que fundamenta ou reforça previsões geológicas (Broda e Peschek, 1983).

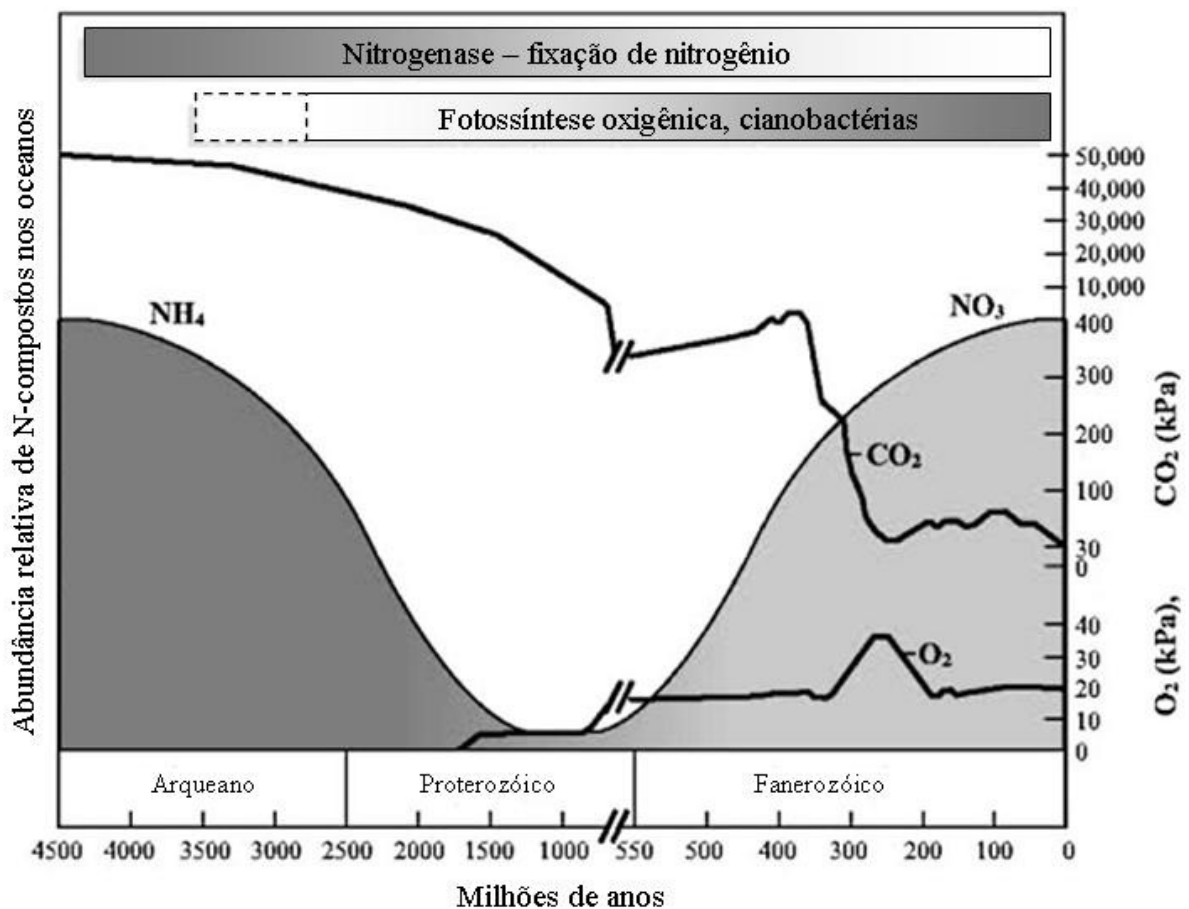
A função das nitrogenases primitivas e as pressões seletivas a que foram submetidas são alvo de debate e dependem dos cenários que definem a atmosfera e oceanos primitivos, especificamente o estado de oxidação, a forma molecular e a concentração dos gases (Towe, 1996; Fani, Gallo e Liò, 2000; Towe, 2002). Modelos físicos sugerem que a atmosfera primordial teria sido medianamente redutora com  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  como os gases majoritários de efeito estufa (Catling, Zahnle e McKay, 2001; Kasting e Siefert, 2001; Kasting e Siefert, 2002). Nessas condições, muitos cenários são propostos. No primeiro, a amônia seria abundante inicialmente e as formas primitivas de nitrogenase evoluíram como enzimas respiratórias – sendo o  $\text{N}_2$  uma fonte de elétrons acessível para heterótrofos anaeróbios sob condições

anaeróbias – ou uma enzima destoxicante para cianetos e outras moléculas potencialmente danosas (Postgate e Eady, 1988; Fani, Gallo e Liò, 2000). Qualquer aumento na radiação ultravioleta poderia ter causado rápida dissociação do  $\text{NH}_3$  na atmosfera, com uma pequena perda de amônia para os oceanos (Kasting, 2001). Com a diminuição da concentração de amônia livre e de cianetos, a nitrogenase evoluiu, transformando-se no mecanismo prevalente para aquisição de nitrogênio, anterior à oxigenação da atmosfera (Falkowski, 1997). Outro cenário admitido é o rápido seqüestro de carbono pelos oceanos, resultando em baixas concentrações de  $\text{CO}_2$  na atmosfera. Isto deve ter limitado a formação de  $\text{NO}_x$  a partir de  $\text{N}_2$  e  $\text{CO}_2$ , causando uma crise no nitrogênio fixado que poderia ter contribuído para o direcionamento da nitrogenase para a fixação de nitrogênio no início do período Arqueano, em torno de 3,5 bilhões de anos atrás (Kasting e Siefert, 2001).

A mudança de uma atmosfera anóxica para oxigênica – resultante da fotossíntese das cianobactérias – foi problemática para cianobactérias e particularmente para os diazótrofos. Evidências recentes posicionam essa transição entre 2,4 e 2,2 bilhões de anos (Holland, 1997; Summons *et al.* 1999; Farquhar, Bao e Thiemens, 2000; Kasting, 2001).

A oxigenação da atmosfera resultou numa mudança na pressão parcial de oxigênio ( $p\text{O}_2$ ) de  $<4.10^{-6}$  para  $>0,03$  atm (Rye e Holland, 2002; Pavlov e Kasting, 2002). Com esse aumento, ocorreu uma diminuição importante da concentração de  $\text{CH}_4$  e um aumento significativo de radicais hidroxila (Kasting e Siefert, 2002). Essa mudança pode ter influenciado os depósitos globais de nitrogênio reduzido, fosfato e cofatores metálicos requeridos para o crescimento dos organismos. A disponibilidade de fosfato foi limitada devido à alta absorção de minerais ricos em ferro; assim, admite-se que as concentrações de fosfato marinho tenham caído a

valores em torno de dez vezes menores que os atuais: 0,15 – 0,6  $\mu\text{M}$  contra o valor atual 2,3  $\mu\text{M}$  (Bjerrum e Canfield, 2002). A amônia teria sido oxidada a nitrito e nitrato e as vias de nitrificação teriam ganhado importância: a oxidação de amônio a nitrato no oceano e a hipóxia das regiões mais profundas podem ter facilitado a desnitrificação do oceano (Falkowski e Raven, 1997).



**Figura 4.3.** Evolução dos ciclos biogeoquímicos de oxigênio, CO<sub>2</sub>, nitrogênio (amônio e nitrato) e a evolução correspondente das vias metabólicas de fotossíntese oxigênica e fixação de nitrogênio (como presença de nitrogenase). O fragmento pontilhado para a fotossíntese oxigênica permanece em debate sobre sua origem em cianobactérias. Modificado de Falkowski e Raven, 1997.

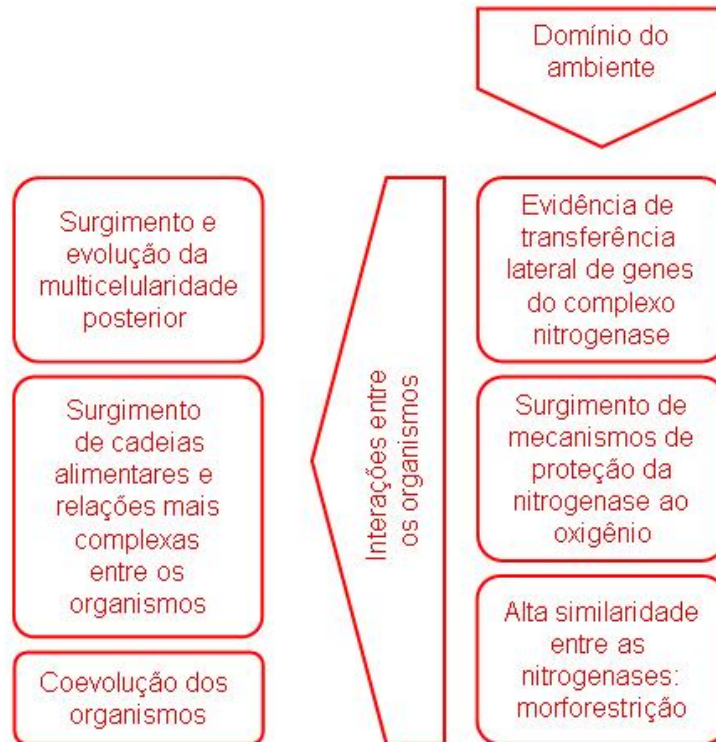
Um ponto de interesse sobre a evolução da fixação de nitrogênio diz respeito à disponibilidade de metais que servem como cofatores. Uma revisão abrangente sobre o assunto foi realizada (Berman-Frank, Lundgren e Falkowski, 2003). Resumidamente, a disponibilidade de elementos como Fe, Mo e V também podem

ter influenciado a evolução das nitrogenases. Seus grupos prostéticos são particularmente vulneráveis a danos por oxigênio e suas espécies reativas (ROS) por levar a oxidação irreversível dos *clusters* Fe-S e Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>. Como a nitrogenase é dependente de Fe, essa disponibilidade influencia na sua atividade por interferir diretamente na sua síntese. Nos oceanos primitivos, o ferro potencialmente estaria na sua forma reduzida (FeII) mais do que na oxidada (FeIII); similarmente, a disponibilidade de Mo como cofator para a nitrogenase devia ser 90% menor devido ao seqüestro desse metal em sedimentos como complexos de sulfetos insolúveis (Anbar e Knoll, 2002). Assim, admite-se que nitrogenases alternativas (com Fe e V como cofatores) sejam formas mais primitivas da enzima, apesar de atualmente a forma com Mo ser predominante e estar relacionada a grupos que divergiram mais recentemente (Bergman, 1997).

A primeira consequência da transição para uma atmosfera oxigênica é a diminuição da concentração de uma forma importante de nitrogênio assimilável (NH<sub>3</sub>). As glutamato desidrogenases (que serão discutidas na Seção 4.4) já existiam nesses organismos e, portanto, eram as responsáveis pela entrada desse nitrogênio, como já discutido. Nitritos e nitratos não são formas assimiláveis de nitrogênio como tais, só podendo ser indiretamente absorvidos quando convertidos a NH<sub>3</sub>. Portanto, organismo que não fossem capazes de obter NH<sub>3</sub> a partir de nitratos e nitritos, ou não conseguissem fixar, seriam selecionados negativamente.

Essa transição transforma-se num fator de pressão seletiva já que alguns organismos não seriam capazes de obter nitrogênio de fonte alguma. Isso significa que, por outro lado os organismos que possuíam algum aparato enzimático capaz de lidar com ligações triplas, ou melhor, com o N<sub>2</sub>, tinham maior vantagem seletiva.

## 4.2. Mudança do papel fisiológico das nitrogenases e as conseqüências ecológicas.



**Figura 4.4.** Domínio do ambiente pelos organismos capazes de fixar nitrogênio e eventos que colaboraram para a ampla disseminação desses organismos para as mais diversas condições atmosféricas e fisiológicas.

### 4.2.1. Proteção do complexo nitrogenase contra oxigênio molecular

O complexo nitrogenase é sensível a  $O_2$ , que a inativa irreversivelmente. Mas diazótrofos possuem mecanismos que concomitantemente permitem o suprimento de  $O_2$  requerido para obtenção de energia química e protegem a nitrogenase dos seus efeitos deletérios. Algumas estratégias que limitam o acesso do  $O_2$  à nitrogenase se desenvolveram na evolução desses organismos.

- (1) Evitar radicalmente o  $O_2$  vivendo em ambientes anaeróbios estritos.
- (2) Balancear a inativação da nitrogenase com a expressão de nova enzima.
- (3) Gerar uma barreira física que previne a difusão de  $O_2$  até a enzima. Em organismos aeróbios estritos/obrigatórios, essa barreira não pode excluir



completamente o  $O_2$  e não pode impedir a difusão do  $N_2$  pelo organismo. Esse seqüestro seletivo de  $O_2$  ocorre em cianobactérias heterocísticas, que são capazes de fixar nitrogênio e realizar fotossíntese oxigênica simultaneamente. De forma geral, bactérias do gênero *Rhizobium* estão protegidas do contato com oxigênio pelas características estruturais do nódulo simbiótico da raiz da Leguminosa.

(4) Proteção respiratória da nitrogenase, diminuindo a concentração de  $O_2$  para níveis compatíveis com o funcionamento da enzima.

Foi postulado que a atividade respiratória descoplada tem efeito protetor sobre a nitrogenase contra  $O_2$  (Robson e Postgate, 1980). Particularmente *Azotobacter sp* é capaz de ajustar sua taxa respiratória numa ampla faixa de concentrações de  $O_2$ . Está amplamente demonstrado que *A.vinelandii* possui uma cadeia respiratória ramificada e o papel de sua citocromo oxidase terminal – responsável pela redução de  $O_2$  a  $H_2O$  – é o passo chave para evitar danos à nitrogenase. Uma cepa/linhagem mutante com alterações no citocromo é capaz de fixar nitrogênio somente em anaerobiose estrita.

Quando a proteção respiratória não está funcionando no seu nível mais alto em *Azotobacter chroococcum*, a redução de  $O_2$  por nitrogenase pode cooperar para evitar sua inativação por um processo denominado auto-proteção. A nitrogenase é competente para reduzir  $O_2$  quando a célula/organismo tem altos níveis de energia e potencial redutor. A redução parcial de  $O_2$  gera radicais livres cujas concentrações dependem dos níveis de  $O_2$  e Fe-proteína. O ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e seu derivado peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são eliminados pela superóxido dismutase (SOD) e pela catalase (Thorneley e Ashby, 1989). A atividade dessas enzimas fica duplicada enquanto as células fixam nitrogênio (Dingler e Oelze, 1987). Mutantes da Fe-proteína mostram baixa viabilidade, assim como as cepas selvagens crescidas

sob restrição de ferro, provavelmente devido às altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (Maier e Moshiri, 2000). O mecanismo de autoproteção também foi observado em outros membros dos *Azotobacter* e cianobactérias.

(5) Modificar a nitrogenase de forma a torná-la resistente à inativação por O<sub>2</sub>. Sob estresse por O<sub>2</sub> ou disponibilidade limitada de fontes de carbono, a atividade da nitrogenase cessa. Assim que a concentração de O<sub>2</sub> decresce, a atividade nitrogenásica é recuperada sem a síntese *de novo* de enzima (Scherings, Haaker e Veeger, 1977 e Scherings *et al.*, 1983). Extratos brutos de *Azotobacter vinelandii* são relativamente resistentes à exposição a O<sub>2</sub>. Nestas condições, uma forma inativa de FeS(II) foi isolada (Shethna, DerVartanian e Beirnert, 1968). Seu mecanismo de regulação não está completamente elucidado, mas foi postulado que um fluxo alternativo de elétrons é estabelecido entre o complexo FeS(II) e a nitrogenase; também se presume que o estado redox da proteína FeS(II) é o principal mediador da interação entre eles. Quando a concentração de O<sub>2</sub> cai a níveis não estressantes, a nitrogenase e o complexo FeS(II) se desacoplam, causando a recuperação da atividade da nitrogenase (Moshiri *et al.*, 1994). Este mecanismo é chamado de proteção conformacional (Robson e Postgate, 1980). A ocorrência desses mecanismos revela a possibilidade de colonização de ambientes aeróbios pelos diazotófos, assim como de ambientes marinhos pelas cianobactérias fixadoras de nitrogênio. Teoricamente, um microorganismo é capaz de proteger o complexo nitrogenase do O<sub>2</sub> por mais de um único mecanismo descrito. Uma ampla revisão sobre esse assunto foi realizada (Soto-Urzúa e Baca, 2001).

Muitas revisões estão disponíveis sobre a estrutura e atividade da nitrogenase (Burgess e Lowe, 1996, Howard e Rees, 1996). Do ponto de vista da ecologia, um estudo recente (Capone e Knapp, 2007) discute a necessidade de

reavaliação da fixação de nitrogênio em ambientes marinhos, sugerindo que a FBN nesse ambiente não é um fenômeno localizado, mas articula muitos organismos e ambientes. Evidências recentes também mostram que as *Archaea* têm um papel central no ciclo do nitrogênio marinho uma vez que estes organismos são importantes na nitrificação e estão envolvidos na fixação de nitrogênio (Capone e Knapp, 2007). Indo além, a ocupação de habitats microaerófilos como o trato digestivo de insetos e espaços endofíticos também são responsáveis pela crescente evidência de que a colonização por diazótrofos é expressiva e significativa quantitativamente para além da rizosfera. Uma recente revisão desse assunto mostra a amplitude da ocupação ambiental por diazótrofos (Montagna e Torres, 2008).

Além desses mecanismos individuais, já foram identificados mecanismos presentes em colônias que também permitem a coexistência da respiração aeróbia e a fixação de nitrogênio. *Gluconacetobacter diazotrophicus* é um diazótrofo colonizador endofítico de cana-de-açúcar, que não forma qualquer tipo de estrutura simbiótica com o hospedeiro, e mantém fixação de nitrogênio em presença de concentrações relativamente altas de oxigênio se comparado a outros diazótrofos. Foi investigada a capacidade de crescimento desse organismo em meio sólido, com manutenção da fixação de nitrogênio, e demonstrou-se que havia tanto a produção de uma matriz mucilagínosa como uma organização da colônia no meio de cultura que mantinha os níveis de O<sub>2</sub> compatíveis tanto com a respiração como com a fixação de nitrogênio (Dong *et al.* 2002).

Esses mecanismos permitem a ampla disseminação dos diazótrofos e desconstruem a visão de que a fixação de nitrogênio é um evento restrito a alguns

nichos. Esse universo é expandido para um panorama muito mais amplo como será mostrado a seguir.

#### 4.2.2. A ecologia dos diazótrofos

##### 4.2.2.1. Solo

A análise da ocorrência de diazótrofos em solos é mostrada na tabela 4.3.

Tipo de Solo	Organismos	Detecção*	Gene detectado	Referência
Solo ácido de floresta do temperado continental europeu	<i>Espécies não isoladas</i>	DGN RA	<i>nifH</i>	Mergel <i>et al.</i> , 2001
Solo ácido	<i>Frankia spp.</i> <i>Azospirillum spp.</i> <i>Clostridium spp.</i>	DGN RA	<i>nifH</i>	Rösch <i>et al.</i> , 2002
Solo costeiro/litorâneo	<i>Beijerinckia derxii</i>	DGN RA	<i>nifH</i>	Miyasaka <i>et al.</i> , 2003
Tundra siberiana	<i>Methylocella sp.</i>	DGN CI	<i>nifD</i>	Dedysh <i>et al.</i> , 2004
Floresta de coníferas siberiana	<i>Methylocella sp.</i> <i>Methanococcus sp.</i>	DGN CI	<i>nifH</i> <i>nifD</i>	Dedysh <i>et al.</i> , 2004
Bacia de rio do temperado continental europeu	<i>Methylosynus sp.</i>	DGN CI	<i>nifH</i> <i>nifD</i>	Dedysh <i>et al.</i> , 2004
Solo e alagado do eixo dos rios Amazonas - Solimões	<i>Nostoc sp.</i> <i>Calothrix sp.</i> <i>Cylindrospermum sp.</i> <i>Fischerella sp.</i> <i>Anabaena sp.</i>	RA	-	Fiore <i>et al.</i> , 2005

\*DGN = Detecção de gene *nif*; RA = Atividade de nitrogenase medida por redução de acetileno; CI = Crescimento e isolamento de diazótrofos

**Tabela 4.3.** Ocorrência de FBN no solo

Diazótrofos podem ser encontrados num amplo espectro de temperaturas, da tundra siberiana ao quente e úmido solo da floresta amazônica. Das 12 espécies

listadas, apenas três foram descritas anteriormente nos trabalhos clássicos sobre diazótrofos.

Outro fato a ser destacado é a presença de diazótrofos em solos da costa marinha/praias, que têm tanto a salinidade como a oxigenação em níveis bem mais altos em comparação ao solo de floresta. Organismos previamente descritos na rizosfera da cana de açúcar, em condições de vida livre (*Beijerinckia sp*) também foram encontrados em solo de praia/litorâneo.

#### 4.2.2.2. Água-doce e alagados/mangues

Diazótrofos foram encontrados em mangues/alagados sem prévia descrição de sua ocorrência na água-doce do rio que compõe o sistema. Entretanto, deve-se notar a impossibilidade de isolar sua ocorrência exclusivamente a um desses ambientes uma vez que há uma sobreposição e interconversão sazonal entre o rio e seus alagados. Uma vez que as florestas equatoriais são responsáveis pelos ecossistemas com maior variabilidade de espécies animais e vegetais, a ocupação desses ambientes por diazótrofos não parece ser tão crítica para a manutenção do ecossistema como seria para ambientes mais restritivos, como os mostrados na tabela 4.3.

#### 4.2.2.3. Água/Ambiente aquático

A análise dos diazótrofos presentes em ambientes aquáticos é mostrada na tabela 4.4.

	Ambiente	Organismos	Deteção*	Gene detectado	Referencia
Água-doce	Lago alcalino	<i>Phormidium sp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Desulfovibrio spp.</i> 13 unidentified species	CI RA	<i>nifH</i>	Steward <i>et al.</i> , 2004
	Lago antártico congelado	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Azospirillum brasilense</i> <i>Aquaspirillum sp.</i>	DGN CN	<i>nifH</i>	Priscu <i>et al.</i> , 1999 Eckford <i>et al.</i> , 2002
Marinho	Pacífico norte subtropical (até 25m de profundidade)	<i>Trichodesmium sp.</i>	DGN CN	<i>nifH</i> <i>nifD</i>	Capone <i>et al.</i> , 1997
	Pacífico norte subtropical (até 25m de profundidade)	<i>Trichodesmium sp.</i> <i>Cyanothece sp.</i> <i>Richelia sp.</i> <i>Synechocystis sp.</i>	DGN CN	<i>nifH</i> <i>nifD</i> <i>nifK</i>	Zehr <i>et al.</i> , 2001

\*DGN = Detecção de gene *nif*; CN = Atividade da nitrogenase medida pelo consumo de N<sup>15</sup>; CI = Crescimento e isolamento de diazotófos

**Tabela 4.4.** Ocorrência de FBN na água.

Em água-doce foram descritas 13 espécies não identificadas de diazotófos ou, ao menos, 13 espécies de organismos capazes de fazer FBN; e ainda outras 14 espécies não identificadas, sendo que apenas cinco delas foram previamente descritas. Considerações sobre a temperatura da água em que é descrita FBN são similares às feitas para o solo. Além das conhecidas ocorrências em temperaturas moderadas, o habitat de diazotófos agora foi expandido incluindo um lago congelado na Antártica. Outro espectro considerável é sua ocorrência desde água-doce até lago alcalino, de alta salinidade.

Enquanto as cianobactérias não heterocísticas *Trichodesmium spp.* são os diazotófos dominantes nos oceanos tropicais (Capone *et al.*, 1997), espécies heterocísticas dominam a fixação de nitrogênio em água-doce (Staal, Meysman e Staal, 2003).

Em ambientes marinhos um novo cenário surge com dados recentes sugerindo que não apenas eventos locais regulam o ciclo de nitrogênio, mas eventos globais, envolvendo diferentes organismos e suas inter-relações, passando por diferentes estratos do oceano e os organismos que ali vivem. Esses ambientes não só estão relacionados pelo balanço de nitrogênio e fósforo, mas por que a FBN conecta diferentes organismos no balanço entre nitrificação e desnitrificação.

Fendas hidrotermais de águas marinhas profundas (*Deep sea hydrothermal vents*) também se mostraram ancorando Archaea metanogênicas, capazes de reduzir  $N_2$  a  $NH_3$  em temperaturas superiores a  $92^\circ C$  e expressando RNA mensageiro de *nifH* (Mehta e Baross, 2006). Este exemplo ilustra o espectro de ocorrência bem mais amplo de ecossistemas que o previamente estimado.

Entretanto, o *input* majoritário de nitrogênio é levado a cabo pelas cianobactérias, tanto de vida livre como simbióticas com protozoários. A vasta dispersão de cianobactérias pelos mares tropical e subtropical sugere um elevado *input* de compostos nitrogenados para a base da cadeia alimentar nesses ambientes. Trabalhos anteriores presumiram que diazótrofos marinhos não eram capazes de suprir o ciclo do nitrogênio como um todo. Trabalhos recentes indicam a necessidade de revisão deste conceito (Capone e Knapp, 2007). Novos dados sugerem uma relação mais complexa entre organismos nitrificantes e desnitrificantes nos oceanos, sugerindo que a FBN não é um fenômeno local, mas está ligado a vários organismos e funciona numa escala global de regulação.

#### 4.2.2.4. Intracelular

A ocorrência de diazótrofos intracelulares (tabela 4.5) levanta considerações interessantes sobre o metabolismo de nitrogênio do hospedeiro.

Tipo de célula	Organismos	Detecção*	Gene detectado	Reference
Protozoário marinho ( <i>Rhopalodia gibba</i> )	<i>Cyanothece sp.</i>	DGN	<i>nifD</i>	Prechtl <i>et al.</i> , 2004
Protozoário marinho ( <i>Climacodium sp.</i> )	<i>Synechococcus sp.</i> <i>Gloeocapsa sp.</i> <i>Cyanothece sp.</i>	DGN	<i>nifH</i> <i>nifD</i>	Falcón <i>et al.</i> , 2002

\*DGN = Detecção de gene *nif*.

**Tabela 4.5.** FBN Intracelular

Dados sugerem que algumas diatomáceas (*Epithemia* e *Rhopalodia*) foram capazes de crescimento em meio de cultura sem nitrogênio que não o N<sub>2</sub>, demonstrando que as cianobactérias simbiotes possuem o aparato ativo para fixação de nitrogênio; entretanto, a origem verdadeira desses endossimbiontes ainda não está clara (Prechtl *et al.* 2004). Poucos dados sobre essa interação estão disponíveis. Igualmente, a importância da biomassa dos protozoários marinhos para o ciclo do nitrogênio não é clara. De qualquer forma, como as cianobactérias e as Archaea parecem ser os principais diazotófos no ambiente marinho, eles podem compor com os protozoários esse vasto cenário.

#### 4.2.2.5. Endofíticos

Muitos grupos de plantas que não as leguminosas e as gramíneas, em ambientes variados, hospedam diazotófos. Quase todos os tecidos e órgãos vegetais abrigam diazotófos. Apesar do mecanismo dessas interações não estar completamente elucidado, sua ocorrência é vasta o suficiente para que se note sua importância. De Hoff e Hirsch (De Hoff e Hirsch, 2003) também citam diversos trabalhos que apóiam esse ponto de vista e relatam diversas estratégias de interação e dependência entre a planta e a bactéria, cobrindo as possibilidades de sinalização hormonal entre ambos. Um dado notável na tabela 4.6 é a presença de enterobactérias fixadoras de nitrogênio em algumas gramíneas.



Planta	Organismos	Deteção*	Gene detectado	Referencia
Raiz de Graminaceae de clima frio (9 espécies)	<i>Azospirillum sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	RA CI	-	Haatela, Kari e Sundman, 1983
Graminaceae – partes aéreas	<i>Azospirillum sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i>	DGN RA CI	<i>nifH</i>	Haatela, Kari e Sundman, 1983
<i>Saccharus sp.</i>	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	RA CI	-	Cavalcante e Döbereiner, 1988
Graminaceae – raízes <i>Orhyza sp.</i>	<i>Azoarcus sp.</i>	RA IG	-	Hurek <i>et al.</i> , 1994
<i>Gossipium hirsutum</i>	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	RA	-	McInroy e Kloeper, 1995
<i>Ipomoea batatas</i>	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	RA CI	-	Paula <i>et al.</i> , 1995
<i>Coffea arabica</i> (Rubiaceae)	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	DGN RA CI	<i>nifH</i> <i>nifD</i>	Jimenez-Salgado <i>et al.</i> , 1997
Graminaceae – partes aéreas	<i>Azoarcus sp.</i> <i>Herbaspirillum sp.</i> <i>Acetobacter sp.</i>	DGN RA CI	<i>nifH</i>	Reinhold-Hurek e Hurek, 1998
<i>Ananas comosus</i> (Bromeliaceae)	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	DGN AR IG	<i>nifH</i>	Tapia-Hernández <i>et al.</i> , 2000
<i>Musa spp.</i> (Banana) <i>Ananás comosus</i> L.	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>H. rubrisubalbicans</i> , <i>Burkholderia brasiliensis</i> <i>B. tropicalis</i>	DGN	<i>nifH</i>	Cruz <i>et al.</i> , 2001
Graminaceae – partes aéreas; <i>Gossipium hirsutum</i> <i>Zea mays</i> <i>Triticum aestivum</i>	<i>Serratia marescens</i>	DGN CI DE CN	<i>nifH</i>	Gyaneshwar <i>et al.</i> , 2001
<i>Orhyza sp.</i>	<i>Azoarcus sp.</i> <i>Herbaspirillum sp.</i> <i>Ideonella sp.</i> <i>Azospirillum sp.</i>	DGN RA CI	<i>nifH</i>	Elbeltagy <i>et al.</i> , 2001
<i>Cucumis sativus</i> L. (Pepino)	<i>Serratia sp.</i>	DGN	<i>nifH</i>	Juraeva <i>et al.</i> 2006
<i>Dryas integrifolia</i> <i>Cassiope tetragona</i> <i>Salix arctica</i> (Ártico canadense)	<i>Firmicutes</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	DGN	<i>nifH</i>	Deslippe e Egger, 2006

\*DGN = Detecção de gene *nif*, CN = Atividade da nitrogenase medida pelo consumo de N<sup>15</sup>; CI = Crescimento e isolamento de diazotófos; DE = Detecção de diazotófos por ELISA.

**Tabela 4.6.** FBN endofítica

A combinação da quantificação de gene *nifH* e a medição da tomada de nitrogênio em plantas pode contribuir para avaliar a contribuição de diazotófos que habitam os tecidos vegetais na nutrição da planta. Apesar desse dado ter sido sugerido, as implicações sobre a necessidade de se medir a abundância de *nifH* e sua expressão não pode ser negligenciada (Juraeva *et al.*, 2006).

#### 4.2.2.6. Insetos

A tabela 4.7 mostra a colonização do trato digestório de térmitas e dípteros por enterobactérias que possuem atividade de FBN.

Inseto	Organismos	Detecção*	Gene detectado	Referencia
Térmitas	<i>Citrobacter sp.</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Desulfovibrio spp.</i>	DGN AR	<i>nifH</i>	Ohkuma <i>et al.</i> , 1999
<i>Ceratitis capitata</i> (díptera)	<i>Enterobacter spp.</i> <i>Klebsiella sp.</i>	DGN AR	<i>nifH</i>	Behar <i>et al.</i> , 2005
<i>Anastrepha ludens</i> (díptera)	<i>Enterobacter spp.</i> <i>Klebsiella sp.</i>	DGN AR	<i>nifH</i>	Kuzina <i>et al.</i> , 2001
<i>Bactrocera tryoni</i> (díptera)	<i>Enterobacter spp.</i> <i>Klebsiella sp.</i>	DGN AR	<i>nifH</i>	Murphy <i>et al.</i> , 1994
<i>Rhagoletis pomonella</i> (díptera)	<i>Enterobacter spp.</i> <i>Klebsiella sp.</i>	DGN AR	<i>nifH</i>	Lauzon <i>et al.</i> , 1998

\*DGN = Detecção de gene *nif* AR = Atividade nitrogenásica medida por redução de acetileno.

**Tabela 4.7.** FBN em trato digestório de insetos.

Também se sabe que algumas enterobactérias comuns como *Klebsiella sp.* são capazes de fixar nitrogênio sob condições específicas. Entretanto, os dados na tabela 4.7 mostram que outras enterobactérias também mostram essa capacidade. As enterobactérias são amplamente distribuídas na natureza, tanto em vida livre como residentes/colonizadoras do trato digestório de muitos vertebrados terrestres. Este fato permite especular acerca da habilidade desses organismos de fixar

nitrogênio *in vivo*, dentro do trato digestório, uma vez que essa habilidade só foi demonstrada *in vitro*. É razoável questionar se a FBN por diazótrofos entéricos é relevante para a tomada de nitrogênio pelo hospedeiro. Por outro lado, em relação às enterobactérias, uma sugestão atraente é a possibilidade dessa fixação de nitrogênio aumentar sua autonomia quando fora do trato digestório, contribuindo para sua notória capacidade de disseminação. A situação é similar à dos protozoários marinhos com diazótrofos intracelulares, que são capazes de crescer sem outra fonte de nitrogênio que não o N<sub>2</sub> atmosférico. Mais dados são necessários para esclarecer essa questão.

Os insetos representam uma das principais formas de vida da Terra, sendo aproximadamente 900,000 espécies descobertas, cobrindo 75% de todas as espécies de animais já identificados. Insetos podem ser encontrados em quase todos os ecossistemas, de desertos à Antártida e mesmo na superfície de oceanos (*Halobates*) (Behura, 2006).

Assim, não parece inapropriado extrapolar a presunção de que, uma vez que alguns representantes desse filo estão colonizados por enterobactérias capazes de fixar nitrogênio, outros também potencialmente podem possuí-las. Além disso, uma vez que os insetos representam uma porcentagem significativa da biomassa terrestre, a fixação de nitrogênio nesses organismos torna-se relevante para o ciclo do nitrogênio global, com importância quantitativa para o processo como um todo.

Uma revisão sobre a distribuição de diazótrofos simbiotes em insetos relata dados que reforçam o cenário citado bem como expande a discussão sobre as necessidades nutricionais e a impossibilidade de compatibilidade com a vida para determinados insetos sem a presença/participação efetiva de simbiotes fixadores de nitrogênio (Nardi, Mackie, Dawson, 2002).

Outra hipótese é a possibilidade de extrapolar a colonização do trato digestório de dípteros e térmitas para outros insetos herbívoros relacionados. Uma vez que diazótrofos (especialmente enterobactérias) são encontrados em gramíneas, é possível que eles alcancem o trato digestório de herbívoros. Uma vez lá, esses diazótrofos preservam sua capacidade de FBN? Em caso positivo, eles devem contribuir significativamente para a tomada de nitrogênio do hospedeiro.

Foram encontrados organismos tanto capazes como efetivos em fixação de nitrogênio em estações de tratamento de efluentes, mostrando que coliformes têm uma fixação de nitrogênio apreciável (0.87 to 4.90 mg de N.litro<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) sendo que algo em torno de 27% das bactérias isoladas em ágar McConkey – *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* K12 (MM294A), *Azoarcus tolulyticus*, *Pseudomonas stutzeri* JM300 – apresentaram capacidade fixar nitrogênio, medida por acetileno e com presença de genes nifH (Gauthier *et al.*, 2000). Esse dado pode abrir espaço para a questão dos enterossimbiontes em mamíferos e o papel que eles potencialmente desempenham.

#### 4.2.2.7. Rizosfera do árido e deserto

É classicamente admitido que a simbiose Leguminosa/Rhizobium ocorre num amplo espectro de representantes dessas espécies. Não surpreende o fato de algumas delas ocorrer em ambientes desérticos e semi-áridos (tabela 4.8).

Clima	Organismos	Detecção*	Detected gene	Reference
Leguminosas selvagens – ambiente quente e árido	<i>Rhizobium sp.</i> <i>Bradyrhizobium sp.</i> <i>Mesorhizobium sp.</i> <i>Sinorhizobium sp.</i>	DGN AR CI	<i>nifH</i>	Zahran, 1999
Leguminosas	<i>Ralstonia sp.</i> <i>Burkholderia sp.</i>	DGN AR CI	<i>nifH</i>	Chen <i>et al.</i> , 2003
Leguminosas selvagens de clima árido	<i>Rhizobium sp.</i>	DGN AR CI	-	Zahran <i>et al.</i> , 2001

\*DGN = Detecção de gene *nif*; AR = Atividade nitrogenásica medida por redução de acetileno; CI = Crescimento e isolamento.

**Tabela 4.8.** FBN por *Rhizobium* de ambientes restritivos

Outras plantas que crescem nesses ambientes também são potencialmente colonizadas por diazótrofos, contribuindo para o *input* de compostos nitrogenados na cadeia ecológica/alimentar. Esse é um fato notável, uma vez que os referidos ambientes são pobres em biodiversidade e apresentam reciclagem de compostos orgânicos devida à estrutura mais frágil desse ecossistema.

#### 4.2.2.8. Líquenes

Outra associação biológica com diazótrofos é encontrada em líquenes. A habilidade de FBN em líquenes era atribuída à presença de cianobactérias na associação e pouca importância quantitativa lhe foi dada devido à sua baixa ocorrência. FBN foi posteriormente encontrada em associações entre fungos e algas verdes, onde demonstrou-se um terceiro elemento, um diazótrofo, como participante da associação – um dos primeiros descritos foi o gênero *Acinetobacter* (Liba *et al.*, 2006). Com mais uma enterobactéria sendo representada nesta associação, as mesmas considerações feitas sobre a presença deste tipo de bactéria em tratamentos digestórios de insetos são válidas neste caso.

Uma vez que os fungos liquenizados são amplamente distribuídos na natureza e representam em torno de 20% de todas as espécies de fungos e em torno de 85% dos fungos liquenizados compõem associações com microalgas verdes, 10% com cianobactérias e 4% com ambas simultaneamente, potencialmente quase todos os líquenes contribuem para a FBN (Liba *et al.*, 2006), permitindo a essa associação enfrentar condições severas de disponibilidade de nutrientes (Strobel e Daisy, 2003).

Estima-se que a fixação biológica de nitrogênio a partir de nitrogênio atmosférico tem contribuição no *input* de nitrogênio pela cobertura/forragem de líquenes em florestas boreais em torno de 2.0 kg N.ha<sup>-1</sup>ano<sup>-1</sup> (DeLuca *et al.*, 2002). Esse dado reforça observações anteriores que questionavam a capacidade de fixação de nitrogênio por *Pleurotus* spp. (Jayasinghearachchi e Seneviratne, 2004), um actinomiceto. Entretanto, o assunto permanece em discussão.

É possível questionar se as ocorrências de todos os organismos listados nas tabelas 4.3 a 4.8 são exceções, mas esse não parece ser o caso. Os dados aqui apresentados mostram diazótrofos “clássicos” em novos habitats e, recentemente, FBN feita por diazótrofos “não-clássicos” em insuspeitos novos habitats. Mais importante do que a colonização de habitats extremos são os habitats comuns colonizados por diazótrofos comuns. Concomitantemente, muitos trabalhos demonstram grande similaridade entre as nitrogenases e sugerem transferência lateral de genes entre organismos não relacionados (Henson, Watson e Barnhum, 2003). As possibilidades de colonização por diazótrofos fixando nitrogênio em condições fisiológicas vão além da extensão listada nas tabelas 4.3 a 4.8 e provavelmente incluem muitos outros ambientes. Essas possibilidades serão aumentadas quando diazótrofos ainda não descritos vierem à luz.

Claramente é necessário recalibrar o espectro dos organismos fixadores de nitrogênio fora da rizosfera e sua importância no ciclo biogeoquímico do nitrogênio considerando a magnitude da distribuição dos diazótrofos. Os dados recentes mostram uma realidade diferente e transformam um sistema previamente tido como frágil e que estava restrito a nichos ecológicos muito específicos em um grande tubo introduzindo compostos nitrogenados utilizáveis na cadeia ecológica.

Assim, os organismos capazes de fixar nitrogênio se disseminaram para praticamente qualquer ambiente, sendo em simbiose ou vida-livre. E o resultado líquido da fixação de nitrogênio não é atrelado à atividade/presença exclusiva da nitrogenase, mas sim, do processo fisiológico completo que está intimamente associado (ou melhor, orquestrado) à formação de  $\alpha$ -aminoácidos e não  $\text{NH}_3$ . Sendo assim, o foco da restrição à assimilação de nitrogênio diretamente da forma de  $\text{NH}_3$  pela GDH sai desse ponto e recai sobre as aminotransferases, já que elas são as enzimas que efetivamente catalisam reações com o nitrogênio que chega na forma de  $\alpha$ -aminoácidos do ambiente e é a partir desses compostos que as sínteses de compostos nitrogenados são levadas a termo nas suas respectivas vias.

### **4.3. Produto final das nitrogenases *in vivo***

*4.3.1. Produtos resultantes do metabolismo orquestrado da malha onde a nitrogenase é o ponto inicial*

Apesar de a nitrogenase ter como produto final o  $\text{NH}_3$ , essa substância é prontamente ligada a um esqueleto carbônico *in vivo*. Experimentos de diversos campos que estudam diazótrofos mostraram que os compostos disponibilizados no meio são  $\alpha$ -aminoácidos.



**Figura 4.4.** As conseqüências metabólicas da formação de aminoácidos como produto final das nitrogenases.

De forma geral, o aminoácido varia de acordo com a fonte de carbono oferecida no meio de cultura. E em cianobactérias essa produção está associada à GS-GOGAT, mostrando que o  $\text{NH}_3$  gerado pela nitrogenase de fato é imediatamente incorporado num esqueleto carbônico, formando especificamente glutamato. Deve-se destacar aqui que um conjunto de dados importante surge nesse momento, o produto final da atividade da nitrogenase. Apesar da reação catalisada pela nitrogenase ser a conversão de  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_3$ , em condições fisiológicas nos organismos, esse produto existe no ambiente celular por um momento muito curto. De fato, uma parcela significativa dos organismos de alguma forma acaba tendo como produto final algum  $\alpha$ -aminoácido. A tabela 4.9 mostra os produtos regularmente excretados identificados em diversas condições para os organismos citados.



Produção de aminoácidos por fixadores de nitrogênio				
Organismo	Aminoácido encontrado em maior concentração	Fase de crescimento	Influência da fonte de carbono	Referência
<i>Chlorobium tepidum</i> (bactéria termofílica verde do enxofre)	Glu e Gln via GS/GOGAT incorporando NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Exponencial	Não disponível	Wahlund e Madigan, 1993
<i>Rhizobium sp.</i> <i>Sinorhizobium sp.</i> <i>Bradyrhizobium sp.</i> <i>Mesorhizobium sp.</i>	Glutamato Aspartato	Exponencial	Baixa ou nula	González-López <i>Et al.</i> , 1995
Idem	Variável de acordo com a fonte de carbono.	Estacionária	Baixa ou nula	idem
<i>Azospirillum sp.</i> <i>Azotobacter sp.</i>	Variável de acordo com a fonte de carbono.	Estacionária	Variável de acordo com a fonte de carbono	idem
<i>Beijerinckia deroxii</i>	Glutamato Alanina Lisina	Estacionária	-	Miyasaka <i>et al.</i> , 2003
<i>Beijerinckia indica</i> <i>Azotobacter chroococcum</i> <i>Corynebacterium sp</i>	Qualitativa e quantitativamente variável de acordo com a fonte de carbono.	Exponencial; Estacionária	Variável de acordo com a fonte de carbono	Pati <i>et al.</i> , 1994
<i>Rhizobium sp.</i> <i>Mesorhizobium sp.</i>	Alanina	Em simbiose, <i>in vivo</i> .	-	Waters <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhizobium sp.</i> <i>Sinorhizobium sp.</i> <i>Bradyrhizobium sp.</i> <i>Mesorhizobium sp.</i>	- Alanina - Glutamato	- Em simbiose - Em espécies de vida livre, <i>in vivo</i> .	-	Day <i>et al.</i> , 2001
<i>Azotobacter chroococcum</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>In vitro</i>	-	Narula <i>et al.</i> , 1984
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Qualitativa e quantitativamente variável de acordo com a fonte de carbono.	Coleta em vários tempos de incubação	Variável de acordo com a fonte de carbono.	González-López <i>et al.</i> , 2005
<i>Trichodesmium spp</i>	Glutamato e glutamina via GS/GOGAT incorporando NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> formado pela nitrogenase.	Coleta em vários tempos de incubação; incorporação de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <i>in vivo</i> com alta atividade específica de GS/GOGAT	-	Mulholland e Capone, 2000
<i>Synechocystis sp.</i> <i>Anabaena sp.</i> <i>Gloeobacter sp.</i> <i>Phormidium sp.</i>	Glutamato e glutamina via GS/GOGAT incorporando NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> formado pela nitrogenase.	Coleta em vários tempos de incubação; incorporação de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <i>in vivo</i> com alta atividade específica de GS/GOGAT	-	Muro-Pastor <i>et al.</i> , 2005

**Tabela 4.9** – Produto final excretado em meio de cultura por diazótrofos.

Os dados das tabelas 4.9 a 4.11 indicam que aminoácidos são o produto fisiológico da fixação de nitrogênio e quais enzimas estão presentes e ativas nessas condições.

<b>Atividade de nitrogenase em células intactas de <i>C. tepidum</i></b>	
<b>Condições de crescimento</b>	<b>Atividade da nitrogenase</b>
N <sub>2</sub>	6300
Glutamina (1 mM)	300
Glutamina (10 mM)	<0,1
Amônia (7,5 mM)	<0,1
Amônia (1 mM)	4240
N <sub>2</sub> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> limitante	2450
N <sub>2</sub> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> suplementado	5000
N <sub>2</sub> , no escuro	<0,1

**Tabela 4.10** – As atividades estão expressas em µmol/min/mg. Extraídos de Wahlund e Madigan 1993.

<b>Enzimas de assimilação de amônia em <i>C. tepidum</i></b>			
<b>Condição de crescimento</b>	<b>GS</b>	<b>GOGAT</b>	<b>GDH</b>
N <sub>2</sub>	5078	149	8
Amônia	946	33	12

**Tabela 4.11** – As atividades estão expressas em µmol/min/mg. Extraídos de Wahlund e Madigan 1993.

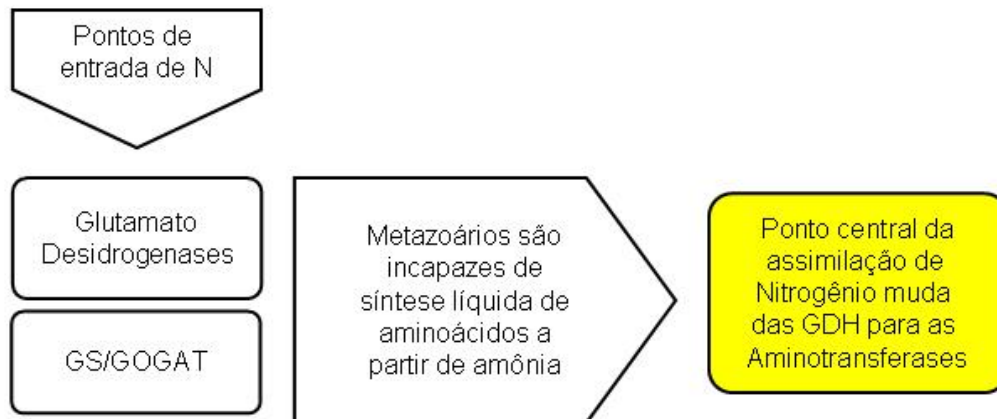
A produção de aminoácidos foi associada ao aparecimento de um sistema que aumenta tanto sua complexidade quanto sua eficiência. Seu aparecimento e fixação conferiram valor adaptativo. Trata-se de um transportador ABC de aminoácidos de ampla especificidade (Aap). Quando seu gene codificador foi mutado, o transporte de glutamato do nódulo para a planta ficou reduzido, ainda que a habilidade da planta na absorção de nitrogênio do bacteróide não tivesse sido

significativamente alterada (De Hoff e Hirsch, 2003). O mesmo grupo ainda identificou outro transportador ABC de espectro ainda mais amplo (Bra). Quando um mutante duplo para aap-bra foi gerado, a planta hospedeira mantinha a capacidade de formar nódulos. Entretanto, essas plantas eram incapazes de absorver as quantidades necessárias de nitrogênio e se tornaram cloróticas, mesmo com os bacteróides expressando nitrogenase ativa e fixando nitrogênio. Ou seja, não só é feito o próprio aminoácido como há um transportador específico para o aminoácido, denotando a coevolução de mecanismos orquestrados que direcionam esses aminoácidos gerados, indo além da possibilidade de admiti-los como produtos finais ou catabólicos. Mesmo porque não é possível imaginar aminoácidos como catabólitos ou excreta, já que há mecanismos que fazem uso desses compostos até sua oxidação total.

O início da formação de uma cadeia ecológica parece ser, portanto, a fixação e o acúmulo de nitrogênio na forma de  $\alpha$ -aminoácidos. Esta forma de nitrogênio torna-se disponível, portanto, para os organismos não fixadores, qualquer que seja a natureza da interação ecológica entre os fixadores e os não fixadores desde que o fixador esteja em nível trófico inferior.

Estas condições impuseram aos organismos duas alternativas: eliminação dos inaptos (incapazes de obter nitrogênio assimilável de alguma forma com a mudança da atmosfera) e expansão ou domínio do ambiente pelos capazes de obter formas de nitrogênio assimiláveis a partir de nitrogênio não assimilável. Ter a nitrogenase é condição necessária, mas não suficiente. A aquisição de um mecanismo de proteção denota a morfo-restrição do sistema de fixação de nitrogênio pela sua alta conservação.

#### 4.4. A captação de nitrogênio pelos metazoários



**Figura 4.5.** Pontos de entrada de nitrogênio na malha metabólica e o ponto em que há uma mudança no papel das GDH em metazoários.

##### 4.4.1. *Glutamato desidrogenases (GDH)*

Estamos aqui admitindo *a priori* as GDH como via de entrada de nitrogênio nos organismos. Em metazoários elas são francamente catabólicas e em procariotos elas são francamente anabólicas.

A GDH catalisa a desaminação oxidativa reversível de L-glutamato a 2-oxoglutarato e amônia. Essa enzima é bastante disseminada (Hudson e Daniel, 1993) e pode ser dividida em quatro classes distintas. GDH-1 e GDH-2 são pequenas enzimas hexaméricas com ampla distribuição taxonômica e utilizam tanto NAD(H) como NADP(H) como coenzima, atuando mormente na assimilação de amônio. Uma classe de GDH maior (GDH-3), que foi primeiramente encontrada somente em fungos e protozoários, tem função catabólica. Finalmente, uma quarta classe (GDH-4) foi recentemente descoberta em Eubacteria e é NAD(H) específica.

Trabalhos recentes da reconstrução filogenética dos genes *gdh* provêm dados consistentes para numerosas transferências desses genes entre procariotos, assim como entre eucariotos microbiais. Perda diferencial de genes, por outro lado, não parece ter sido um evento importante na evolução desses genes. Deve-se

destacar também que as taxas de transferência lateral de genes em procariotos e eucariotos nesse caso são similares, e têm função importante na evolução desses genes (Allen *et al.*, 2004).

Entretanto, apenas as GDH de mamíferos apresentam regulação alostérica complexa. As estruturas de várias GDH já foram determinadas e compartilham um número importante de características estruturais. Todas são homohexaméricas com um “core-domain” de ligação de glutamato. A exclusividade em animais é uma antena que protrusa acima do domínio ligante de  $\text{NAD}^+$ . As três antenas entre os trímeros têm sua conformação modificada e movem-se cooperativamente conforme o domínio ligante de  $\text{NAD}^+$  abre e fecha (Smith *et al.*, 2002). Em mamíferos, as etapas de alterações limitantes da velocidade dependem das condições da enzima. Em pH neutro e baixa concentração de coenzima e substrato, o passo limitante é a transferência de hidrogênio e/ou a mudança conformacional associada ao processo, o movimento do domínio de ligação de  $\text{NAD}^+$ . Na reação de desaminação oxidativa em pHs elevados e altas concentrações de substrato, o glutamato se liga à enzima depois que o  $\text{NAD(P)H}$  se dissocia da fenda catalítica, formando um complexo  $\text{NAD(P)H-Glu}$  com ligação forte. Nessas condições, a transferência de hidrogênio não é mais limitante mas sim a formação e liberação do complexo. Na aminação redutiva, o complexo análogo  $\text{NAD(P)-2-oxoglutarato}$  é formado em altas concentrações de substrato e pH baixo (Bailey, Bell e Bell, 1982). Os dois principais reguladores alostéricos em oposição, ADP e GTP, aparentemente exercem seus efeitos nesses complexos. O ADP é um ativador que, ao menos em parte, se acredita agir na estabilização do complexo. A ligação de GTP é antagonizada por fosfato e ADP, e finalmente, ADP e GTP ligam-se à GDH de forma antagonística devido ou à competição estérica ou a efeitos competitivos na formação do complexo.

A antena aparece primeiramente nos Ciliados. Essa regulação primitiva é mediada por ácidos graxos e reflete o movimento gradual da oxidação de ácidos graxos dos peroxissomos para a mitocôndria uma vez que os ciliados evoluíram separadamente de plantas, bactérias e fungos. Em trabalhos onde se mutou/retirou essa antena, verificou-se que a mesma é essencial para a regulação do metabolismo de ácidos graxos. Quando essa antena dos ciliados é fundida com GDH humana, encontrou-se estreita ligação dela com a regulação da GDH (Allen *et al.*, 2004). A importância deste dado está no primeiro aparecimento de um mecanismo de regulação da GDH que claramente não a deixa submetida ao equilíbrio químico. Como surgiu em protozoários já numa condição ecológica em que o aporte de nitrogênio se dava na forma de aminoácidos e manteve-se até mamíferos, infere-se que o padrão de obtenção de nitrogênio para todos que evoluíram posteriormente, neste ramo, foi único e mantido.

Em outra regulação, leucina, bem como alguns ácidos monocarboxílicos, mostraram atividade ativadora de GDH em mamíferos por aumentar a taxa de liberação do cofator de forma similar ao ADP (Yielding e Tomkins, 1961). Entretanto, devido ao efeito sinérgico observado entre leucina e ADP, esses ativadores aparentemente não se ligam ao mesmo sítio (Prough, Culver e Fisher, 1973). Pelo fato de leucina ser um substrato fraco para GDH, claramente um sítio de ligação é o sítio ativo. A questão principal então é onde estará um segundo sítio, alostérico, para ligação de leucina. Palmitoil-CoA e dietilstilbestrol são inibidores da GDH humana, mas não há dados disponíveis sobre seu local de ligação (Fahien e Kmietek, 1981).

Todas estas regulações indicam que, *in vivo*, o papel da GDH é predominante na malha do metabolismo de nitrogênio. O fato da GDH não ser bidirecional em metazoários (em condições fisiológicas) a coloca em uma posição

privilegiada para controlar o fluxo de entrada/saída de amônio. É um gargalo da entrada de amônio em metazoários.

Estudos demonstraram a importância da GDH *in vivo* no catabolismo de glutamato mas não sua importância como fornecedor de saldo de glutamato em fígado e cérebro de rato, apesar de ambos os órgãos possuírem quantidades apreciáveis de GDH (Cooper *et al.*, 1988). Dados deste mesmo trabalho ainda mostram a rapidez da troca de nitrogênio via aminotransferases *in vivo*. Manchester (1985) descreve as propriedades cinéticas da GDH e sugere que a função da GDH em animais não é a fixação de amônia para a formação de grupo amino, mas o catabolismo de glutamato com a formação 2-oxoglutarato e amônia.

O padrão de regulação (ADP/GTP) *in vivo* pode servir exclusivamente à formação de 2-oxoglutarato e amônia a partir de glutamato. Este fato tem evidências no hiperinsulinismo congênito, no qual crianças têm níveis elevados de amônio no plasma, persistente e elevado. Esta doença é causada por mutações dominantes em GDH que compromete sua sensibilidade ao inibir alostérico GTP (MacMullen *et al.* 2001). Os valores de  $K_m$  para  $NH_4^+$  em algumas GDH são altos. Para GDH bovina, o  $K_m$  é de 3.2mM, que é um nível letal para células (Smith *et al.*1975). O equilíbrio dessa reação favorece a formação de glutamato. Assim, pode-se admitir que as propriedades cinéticas da GDH, juntamente com as regulações alostéricas, ajuda a prevenir uma oxidação exacerbada de glutamato, que por um lado é mantido abundante no fígado e outros órgãos, e por outro, mantém baixa a concentração de amônio.

Deve-se notar também que não é excluída a possibilidade da função fisiológica da reação inversa da GDH. De fato, a síntese de glutamato ocorre no fígado na ausência de aspartato, asparagina e glutamina (Petcu e Plaut, 1980).

Nessas condições, o glutamato formado é exclusivamente consumido no provimento de grupo amino para aspartato, que é fundamental para a subsequente formação de uréia no ciclo da uréia. Esta reação, no entanto, ajusta as concentrações de aminoácidos, mas não promove síntese líquida de glutamato.

Deve-se lembrar que, em mamíferos, a única desaminação de aminoácidos ocorre via GDH e que a produção de  $\text{NH}_4^+$  é necessária para a eliminação de nitrogênio sob a forma de uréia e que, dada a meia vida das proteínas, elas estão constantemente sendo degradadas e a utilização do esqueleto carbônico dos aminoácidos para a gliconeogênese impõe a eliminação do grupo amino que, como foi mencionado, só pode ser liberado por ação da GDH.

Portanto, a atividade está subordinada a regulações, mais do que aos Km para as diferentes espécies que participam da reação. Dado o papel de ativador do ADP, a indução de catabolismo será induzida pelo aumento de sua concentração, preparando a enzima para atividade catabólica que promove a possibilidade de oxidação do esqueleto carbônico do glutamato.

#### *4.4.2. Por que as GDH não são o ponto de entrada em metazoários*

Os dados mostram que as GDH apresentam diferenças estruturais em procariotos e eucariotos, mas no final desempenham o mesmo papel fisiológico. Na verdade, a questão de ser anabólica ou catabólica em um e outro organismo tem relevância somente em relação à existência de regulação – que é o determinante no seu papel fisiológico. Assim, em procariotos ela está sujeita ao equilíbrio químico e em eucariotos está sujeita a diversas regulações por substâncias envolvidas no metabolismo energético celular. Daí a diferença fundamental do seu papel nesses organismos.



A conclusão que se espera demonstrar com clareza é que a GDH não é o elemento limitante da aquisição de nitrogênio para a malha metabólica em metazoários. O fator determinante no papel fisiológico desempenhado por ela está na presença de regulação em eucariotos, e na ausência dessa regulação em procariotos.

Sendo assim, com o foco desviado da GDH, há de se olhar adiante na malha metabólica e encontrar as enzimas que estão posicionadas na direção do fluxo metabólico. Em princípio, poderíamos considerar a Glutamina sintetase. Mas essa enzima, em metazoários, está envolvida na via das purinas, que é uma via de fundo cego para o nitrogênio. O nitrogênio incorporado nessa via não é contabilizado no metabolismo energético e não contribui, portanto, para o saldo líquido de nitrogênio no organismo. Ainda assim, essa enzima é de extrema importância em plantas e alguns fungos, pois ela está intimamente associada à Glutamina-oxoglutarato amino transferase (GOGAT), não detectada em mamíferos. Pela ação conjunta das duas enzimas, há um aproveitamento efetivo do grupo amino que passa da forma amida na glutamina para ser inserido no oxoglutarato na forma amina e, portanto, ser um sistema que contribui para o saldo líquido de síntese de aminoácidos para o organismo – paradigmático para o cenário aqui proposto. Além disso, em metazoários há extensa distribuição celular de GDH: citossol, mitocondrial na membrana e na matriz, todas sujeitas a regulações específicas. Apesar disso, e das regulações e sentidos reacionais possíveis, deve-se notar que não há suprimento ambiental de amônio para metazoários. Como metazoários obteriam amônio do ambiente? Há nitratos e nitritos, mas eles não são utilizáveis por metazoários.

Levando em consideração o exposto, o elemento crítico para as GDH de metazoários é que sua requisição indiscriminada, forçando a reação no sentido

anabólico, tem como conseqüência a depleção das reações anapleróticas do ciclo de Krebs em dois pontos principais: 2-oxoglutarato e via das purinas (via deslocamento do equilíbrio de GS). Com o aumento da concentração de  $\text{NH}_3$ , essas três vias tornam-se pontos de consumo dos compostos do ciclo de Krebs, fazendo com que não haja incorporação efetiva de nitrogênio já que o grupo amino transferido nessas reações tenha destinos outros que a incorporação em esqueletos carbônicos que resultem em aminoácidos.

Em 2-oxoglutarato, o grupo amino é incorporado formando glutamato. Aparentemente, esta seria uma fonte efetiva de nitrogênio. Entretanto, em concentrações mais altas, ou ao menos, nas concentrações necessárias para o suprimento adequado/suficiente de nitrogênio, o processo seria danoso para a manutenção da atividade do ciclo de Krebs por seqüestrar um composto fulcral no seu funcionamento, o 2-oxoglutarato.

Em resumo, todos os dados indicam que a possibilidade de contribuição líquida para a incorporação de amônio via GDH é limitada.

#### *4.4.3. Mudando o foco da GDH para as aminotransferases*

Considerando os pontos mais relevantes até aqui discutidos, chegamos inexoravelmente às aminotransferases.

As GDH são enzimas presentes em organismos muito primitivos e amplamente disseminadas entre os reinos. São, portanto, muito primitivas, e mesmo com algumas modificações estruturais, não sofreram modificações funcionais substanciais, exceto no que concerne à sua regulação, que é momento de transição de sua função fisiológica. Essa transição ocorre, segundo Allen *et al.* (Allen *et al.*, 2004) nos ciliados, que estão muito próximos dos primeiros metazoários ancestrais.

Considerando-se que todos os metazoários evoluíram a partir daí, é lícito admitir que as possibilidades metabólicas e as condições de obtenção de nitrogênio tenham sido fatores determinantes na coevolução.

Enquanto para os procariotos primitivos a GDH desempenhava uma função dependente da concentração de substrato, e que tinha papel francamente anabólico devido à disponibilidade de amônia/amônio no ambiente, sua posição era central no metabolismo de nitrogênio uma vez que essa era a porta de entrada do organismo. Esse panorama se manteve nos procariotos atuais uma vez que possuem mecanismos diversos (GS/GOGAT, por exemplo) para a assimilação de compostos nitrogenados. No caso de organismos que possuem o aparato da GS/GOGAT, a situação é parecida, uma vez que é possível a incorporação do amônio via GDH pois a orquestração do metabolismo e a presença de enzimas que possibilitam essa assimilação os coloca em condições de igualdade nesse cenário.

Já os metazoários, ou seja, todos os não-plantas/fungos/bactérias, não possuíam o aparato metabólico para aquisição de nitrogênio. Por outro lado, na atmosfera oxigênica, e em uma condição onde potencialmente já existem organismos capazes de fixar nitrogênio atmosférico, a disponibilidade de aminoácidos no ambiente, de diversas formas, faz com que o nitrogênio não seja crítico numa cadeia alimentar ou em relações simbióticas mais complexas. Ou seja, os metazoários possuem uma fonte de nitrogênio baseada em outro tipo de composto nitrogenado, não mais inorgânico (agora aminoácidos) e passam a ter regulação nos mecanismos de obtenção e eliminação de nitrogênio. Também é importante essa regulação para não desperdiçar os aminoácidos obtidos como para evitar efeitos deletérios de amônia em pontos importantes do metabolismo.

O metabolismo inicial de nitrogênio, ou o ponto de entrada na malha metabólica, agora está direcionado para o aproveitamento dos aminoácidos obtidos, que servem efetivamente de fonte de nitrogênio. A família de enzimas que é responsável por essas reações são as aminotransferases. Elas transferem efetivamente o grupo amino de um aminoácido pré-formado obtido da dieta, ou do ambiente, e transferem esse grupo amino para um esqueleto carbônico endógeno, sintetizado de acordo com as necessidades do organismo e sob estreita regulação. Ainda se ressalte que as transaminações têm menor custo energético, menor manobra mecânica, menor especificidade e, portanto, promovem a disponibilidade mais flexível de nitrogênio para o organismo. Agora o importante era não perder esse nitrogênio já obtido.

Assim, já que eles não têm problemas com o nitrogênio, o foco da sua obtenção se desloca das GDH e, nos metazoários, se concentra nas aminotransferases, que serão o ponto do metabolismo importante para o aproveitamento efetivo de nitrogênio. De qualquer forma, o cenário muda de uma focalização/centralização na GDH, aparentemente contraditório pelo seu papel fisiológico nos metazoários, e muda para uma família de enzimas que instala uma situação muito menos restritiva quanto a possibilidades metabólicas. O sistema deixa de ter um gargalo e passa ter uma porta de entrada bem mais ampla, mantendo inclusive a GDH com o seu papel no catabolismo e não no anabolismo. Afinal, o consumo de  $\alpha$ -aminoácidos é feito pelas aminotransferases, que se tornam o ponto de entrada de nitrogênio no metabolismo, ou pelo menos, quantitativamente são as responsáveis por isso.

## 5. Síntese final

A disponibilidade de nitrogênio assimilável foi um fator limitante na transição de uma atmosfera redutora (rica em  $\text{NH}_3$ ) para uma atmosfera oxidante (rica em  $\text{O}_2$ ). A nitrogenase conferiu vantagem adaptativa aos organismos que a possuíam (já que ela já estava presente em organismos na condição atmosférica anterior, mas com outra função). Como o produto do metabolismo da fixação de nitrogênio são  $\alpha$ -aminoácidos, e eles foram um fator seletivo para organismos que surgiram posteriormente, já no cenário de uma atmosfera oxigênica. Importante ressaltar que, após a mudança das condições atmosféricas, ainda transcorreu um tempo até aparecerem organismos multicelulares. Admite-se que sequer havia eucariotos - apenas procariotos. Todos os organismos que apareceram na natureza depois (principalmente metazoários) já encontram a atmosfera oxigênica e o nitrogênio, apesar de abundante na atmosfera, em formas quimicamente muito estáveis e de difícil utilização.

Dois motivos colocam a evolução da multicelularidade em destaque: (1). o aumento da complexidade de interação entre os organismos fazendo surgir efetivamente cadeias alimentares. Quando começa a aparecer um organismo que se alimenta de outro, muda a relação entre esses organismos. Isso também se aplica aos consumidores primários, já que as plantas possuem aparato para obtenção de  $\text{NH}_3$  a partir de nitratos e nitritos, além da ampla presença de diazótrofos endofíticos e simbiontes desde os líquens e musgos – explorado na questão ecológica. (2) a presença de diazótrofos em líquens e musgos e em poríferos e celenterados. A situação é análoga para ambos já que eles estão na base da escala evolutiva de dois grandes reinos, reforçando que o que evoluiu depois manteve a característica.

Desta forma, a interação entre os organismos será o fator determinante das particularidades do consumo ou uso desse nitrogênio fixado, seja pelo consumidor que se encontrar em níveis tróficos superiores em relação aos fixadores, seja por organismos que mantêm outras formas de relacionamento ecológico com os diazótrofos.

Assim, apesar da robustez já consolidada dos dados moleculares e computacionais, a incorporação dos dados fisiológicos e ecológicos aos primeiros potencialmente aprimora o processo indutivo/dedutivo na elaboração de modelos de evolução de vias metabólicas, ainda que não se espere que haja um único, mas que sejam mais coerentes e baseados em um corpo de dados que contemple cada vez a complexidade inerente desses sistemas.

## 6. Referências

- Allen A, Kwagh J, Fang J, Stanley CA, Smith TJ.** Evolution of glutamate dehydrogenase regulation of insulin homeostasis is an example of molecular exaptation. *Biochemistry*. 2004. 43:14431-14443.
- Almaas E, Kovacs B, Vicsek T, Oltvai ZN, Barabasi AL.** Global organization of metabolic fluxes in the bacterium *Escherichia coli*. *Nature*. 2004;427, 839–843.
- Alves R, Chaleil RAG, Sternberg MJE.** Evolution of enzymes in metabolism: a network perspective. *J Mol Biol*. 2002;320:751-770.
- Anbar AD, Knoll AH.** Proterozoic ocean chemistry and evolution: a bioinorganic bridge. *Science*. 2002;297:1137–1142.
- Andersson JO, Roger AJ.** Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for lateral gene transfer within and between prokaryotes and eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology*. 2003. 3:14-24.
- Andjus RK, Macura S, Marlday JL.** Brain energetics and tolerance to oxygen deprivation in extreme hypothermia: *in vitro* and *in vivo* NMR studies in four animal. *Comp Bioch Physiol Part B*. 2000;126:S1–9108.
- Bailey JS, Bell ET, Bell JE.** Regulation of bovine glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1982. 257:5579-5583.
- Behar A, Yuval B, Jurkevitch E.** Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Mol Ecol*. 2005;14:2637-2643.
- Behura SK.** Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Mol Ecol*. 2006;15:3087–3113.
- Bergman B.** N<sub>2</sub> fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMs Microbiol Rev*. 1997;19:139–185.
- Berman-Frank I, Lundgren P, Falkowski P.** Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res Microbiol*. 2003;154:157–164.
- Bishop PE, Premaktur R.** Alternative nitrogen fixation systems. 1992. In: *Biological Nitrogen Fixation* (Stacey G, Burris RH, Evans HJ eds.). pp 736-762. Chapman and Hall, New York, NY.
- Bjerrum CJ, Canfield DE.** Ocean productivity before about 1.9 Gyr ago limited by phosphorus adsorption onto iron oxides. *Nature*. 2002;417:159–162.
- Bradley TJ.** Control of respiration in insects. *Comp Bioch Physiol Part B*. 2000;126:S1–9108.
- Brady NC, Weil RR.** In: *The Nature and Properties of Soils*. 1996. Prentice Hall, New Jersey, pp. 418–428.
- BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System**, url: <http://www.brenda.uni-koeln.de/> acessado em outubro de 2008.
- Broda E, Peschek GA.** Nitrogen fixation as evidence for the reducing nature of early biosphere. *BioSystems*. 1983;16:1-8.
- Brooks DR.** What's going on in evolution? A brief guide to some new ideas in evolutionary theory. *Can J Zool*. 1983;61:2637-2645.

- Burgess BK, Lowe DJ.** Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem Rev.* 1996. 96; 2983-3011;
- Capone DG, Knapp AN.** A marine nitrogen cycle? *Nature.* 2007;445:159-160
- Capone DG, Zehr H, Paerl H, Bergman H, Carpenter EJ.** *Trichodesmium*: significant marine cyanobacterium. *Science.* 1997;276:1221-1229.
- Catling DC, Zahnle KJ, McKay C.** Biogenic methane, hydrogen escape, and the irreversible oxidation of early Earth. *Science.* 2001;293:839–843.
- Cavalcante V, Döbereiner J.** A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil.* 1988;108:23-31.
- Chen L, Vitkup D.** Predicting genes for orphan metabolic activities using phylogenetic profiles. *Genome Biol.* 2006;7, R17.
- Chen WH, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Béna G, Boivin-Masson C.** Legume symbiotic nitrogen fixation by  $\beta$ -proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol.* 2003;185(24):7266-7272.
- Cooper AJL, Nieves E, Rosenpire KC, Filc-DeRicco S, Gelbard AS, Brusilow SW.** Short-term metabolic fate of  $^{13}\text{N}$ -labeled glutamate, alanine, and glutamine (amide) in rat liver. *J Biol Chem.* 1988;263:12268–12273.
- Copley RR, Bork P.** Homology among  $(\beta\alpha)_8$  barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. *J Mol Biol.* 2000;303:627-640.
- Cruz LM, Souza EM, Weber OB, Baldani JI, Döbereiner J, Pedrosa FO.** 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Appl Envir Microbiol.* 2001;67(5):2375–2379.
- Davis BK.** The forces driving molecular evolution. *Prog Biophys Mol Biol.* 1998; 69:83-150.
- Day DA, Poole PS, Tyermanc SD, Rosendahl L.** Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58: 61–71.
- De Hoff P, Hirsch AM.** Nitrogen Comes Down to Earth: Report from the 5th European Nitrogen Fixation Conference. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2003;16(5): 371-376.
- Dean DR, Jacobsen MR.** Biochemical genetics of nitrogenase. 1992. In: *Biological Nitrogen Fixation* (Stacey G, Burris RH, Evans HJ eds.). pp 763-834. Chapman and Hall, New York, NY.
- Dedysh SN, Ricke P, Liesack W.** NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology.* 2004;150:1301-1373.
- DeLuca TH, Zachrisson O, Nilsson, M-C, Sellstedt A.** Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. *Nature.* 2002;419: 917–920.
- Deslippe JR, Egger KN.** Molecular Diversity of nifH Genes from Bacteria Associated with High Arctic Dwarf Shrubs. *Microbiol Ecol.* 2006;51, 516–525.
- Dingler C, Oelze J.** Superoxide dismutase and catalase in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture at different dissolved oxygen concentrations. *Arch Microbiol.* 1987;147:291-294;
- Döbereiner J.** Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. *Pl Soil.* 1961.15: 211–216.



- Dong Z, Zelmer CD, Canny MJ, McCully ME, Luit B, Pan B, Faustino RS, Pierce GN, Vessey JK.** Evidence for protection of nitrogenase from O<sub>2</sub> by colony structure in the aerobic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Microbiology*. 2002;148:2293–2298.
- Donoho DL, Mumford D, Olshausen B.** Minds must unite. *The Scientist*. 2005;19 (11);18-20.
- Eckford R, Cook FD, Saul D, Aislabie J, Foght J.** Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated antarctic soil. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(10):5181-5185.
- Edwards JS, Covert M, Palsson B.** Metabolic modelling of microbes: the flux-balance approach. *Environ Microbiol*. 2002;4, 133–140.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K.** Endophytic and in-plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(11):5285-93.
- Fahien LA, Kmiotek E.** Regulation of glutamate dehydrogenase by palmitoyl-coenzyme A. *Arch Biochem Biophys*. 1981. 212:247-253.
- Falcón LI, Ciprano F, Chisloserdov AY, Carpenter EJ.** Diversity of diazotrophic unicellular cyanobacteria in the tropical north atlantic ocean. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(11):5760-5764.
- Falkowski PG, Raven JA.** *Aquatic Photosynthesis*, 1<sup>st</sup> Edition. Blackwell Science, Oxford, p. 375. 1997.
- Falkowski PG.** Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO<sub>2</sub> in the ocean. *Nature*. 1997;387:272–275.
- Fani R, Gallo R, Liò P.** Molecular evolution of nitrogen fixation: the evolutionary history of the *nifD*, *nifK*, *nifE*, and *nifN* genes. *J Mol Evol*. 2000. 51: 1-11.
- Farquhar J, Bao H, Thiemens M.** Atmospheric influence of Earth's earliest sulfur cycle. *Science*. 2000;289:756–758.
- Fiore MF, Neilan BA, Copp JN, Rodrigues JLM, Tsai SM, Lee H, Trevers JT.** Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the brazilian Amazon floodplain. *Water Res*, 2005;39:5017-5026.
- Gauthier F, Neufeld JD, Driscoll BT, Archibald FS.** Coliform bacteria and nitrogen fixation in pulp and paper mill effluent treatment systems. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(12):5155–5160.
- Gauthier F, Neufeld JD, Driscoll BT, Archibald FS.** Coliform bacteria and nitrogen fixation in pulp and paper mill effluent treatment systems. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(12):5155–5160.
- Glazko GV, Mushegian AR.** Detection of evolutionarily stable fragments of cellular pathways by hierarchical clustering of phyletic patterns. *Genome Biol*. 2004;5, R32.
- González-López J, Rodelas B, Pozo C, Salmerón-López V, Martínez-Toledo MV, Salmerón V.** Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. *Amino Acids*. 2005;28: 363–367.
- Green ML, Karp PD.** A Bayesian method for identifying missing enzymes in predicted metabolic pathway databases. *BMC Bioinformatics*. 2004;5, 76.
- Gyaneshwar P, James EK, Reinhold-Hurek B, Lahda JK.** Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marescens*. *J Bacteriol*. 2001;183(8):2634-2645.

- Haahtela K, Kari K, Sundman V.** Nitrogenase activity (acetylene reduction) of root associated, cold climate *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas* species during growth on various carbon sources and at various partial pressures of oxygen. *Appl Environ Microbiol.* 1983;45(2):563-570.
- Halbleib CM, Ludden PW.** Regulation of biological nitrogen fixation. *Rec Adv Nut Sci.* 2000;1081-1084.
- Hanson BJ, Watson LE, Barnum SR.** The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by *nifD*. *J Mol Evol.* 2004;58: 390-399.
- Haselkorn R, Buikema WJ.** Nitrogen fixation in cyanobacteria. 1992. In: *Biological Nitrogen Fixation* (Stacey G, Burris RH, Evans HJ eds.). pp 43-85. Chapman and Hall, New York, NY.
- Hochachka PW, Somero GN.** *Biochemical Adaptation.* Princeton University Press, Princeton, NJ, pp. 4-10. 1984.
- Hochachka PW.** Cross-species studies of glycolytic function. *Adv Exp Med Biol.* 1999;474:219-229.
- Hochachka PW.** Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation. Boca Raton: CRC Press, pp. 34-39. 1993.
- Holland HD.** Geochemistry—evidence for life on Earth more than 3850 million years ago, *Science.* 1997;275:38–39.
- Horowitz NH.** On the evolution of biochemical synthesis. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1945;31:152-157.
- Howard JB, Rees DC.** Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chem Rev.* 1996;96: 2965-2982.
- Hurek T, Reinhold-Hurek B, van Montagu M, Kellenberger E.** Root colonization and systemic spread of *Azoarcus sp.* in grasses. *J Bacteriol.* 1994;176:1913-1923.
- Igarashi RY, Seefeldt LC.** Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2003;38:351–384.
- Ihmels J, Levy R, Barkai N.** Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol.* 2004;22, 86–92.
- Jackson S, Nicolson SW.** Xylose as nectar sugar: from biochemistry to ecology. *Comp Bioch Physiol Part B.* 2002;131(4):613-620.
- Jayasinghearachchi HS, Seneviratne G.** Can mushrooms fix atmospheric nitrogen? *J Biosci.* 2004;29 293–296.
- Jensen RA.** Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annu Rev Microbiol.* 1976;30:409-425.
- Jiménez-Salgado T, Fuentes-Ramírez LE, Tapia-Hernández A, Mascarua-Esparza MA, Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J.** *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing *Acetobacteria*. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(9):3676-3683.
- Juraeva D, George E, Davranov K, Ruppel S.** Detection and quantification of the *nifH* gene in shoot and root of cucumber plants. *Can J Microbiol.* 2006;52:731-739.
- Juraeva D, George E, Davranov K, Ruppel S.** Detection and quantification of the *nifH* gene in shoot and root of cucumber plants. *Can J Microbiol.* 2006;52:731-739.
- Kasting JF, Siefert JL.** Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science.* 2002;296:1066–1068.
- Kasting JF, Siefert JL.** The nitrogen fix. *Nature.* 2001;412:26–27.

- Kasting JF.** The rise of atmospheric oxygen. *Science*. 2001;293:819–820.
- Katagiri M, Nakamura M.** Animals are dependent on preformed  $\alpha$ -amino nitrogen as an essential nutrient. *IUBMB Life*. 2002;53:125-9.
- KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.** url: <http://www.genome.jp/kegg/> [acessado em Outubro de 2008].
- Kharchenko P, Vitkup D, Church GM.** Filling gaps in a metabolic network using expression information. *Bioinformatics*. 2004;20,1178–1185.
- Kim J-W, Dang CV.** Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci*. 2005;30: 142-150.
- Kuzina KM, Peloquin JJ, Vacek DC, Miller TA.** Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephtridae). *Curr Microbiol*. 2001;42:290-294.
- Lauzon CR, Sjogren RE, Wright SE, Prokopy RJ.** Attraction of *Rhagoletis pomonella* (Diptera:Tephtridae) flies to odor of bacteria: apparent confinement to specialized members of Enterobacteriaceae. *Environ Entomol*. 1998;27:853-857.
- Lewontin RC.** Directions in evolutionary biology. *Annu Rev Genet*. 2002;36:1-18.
- Li H, Pellegrini M, Eisenberg D.** Detection of parallel functional modules by comparative analysis of genome sequences. *Nat Biotechnol*. 2005;23, 253–260.
- Liba CM, Ferrara FIS, Manfio GP, Fantinatti-Garboggini F, Albuquerque RC, Pavan C, Ramos PL, Moreira-Filho CA, Barbosa HR.** Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *J Appl Microbiol*. 2006;101:1076–1086.
- Light S, Kraulis P.** Network analysis of metabolic enzyme evolution in *Escherichia coli*. *BMC Bioinformatics*. 2004;5, 15.
- Lorenz K.** Os fundamentos da etologia. Ed UNESP. São Paulo. pp.43-44. 1993.
- MacMullen C, Fang J, Hsu BY, Kelly A, de Lonlay-Debeney P, Saudubray JM, Ganguly A, Smith TJ, Stanley CA.** Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome in children with regulatory mutations in the inhibitory guanosine triphosphate-binding domain of glutamate dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1782–1787.
- Maier RJ, Moshiri F.** Role of the *Azotobacter vinelandii* nitrogenase-protective Shethna protein in preventing oxygen-mediated cell death. *J Bacteriol*. 2000;182:3854-3857;
- Manchester KL.** GDH, a reappraisal. *Biochem Educ*. 1985;13:131–133.
- McInroy JA, Kloepper JW.** Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. *Can J Microbiol*. 1995;41:895-901.
- McManus DP.** Intermediary metabolism in parasitic helminths. *Int J Parasitol*. 1987;17:79-95.
- Mehta MP, Baross JA.** Nitrogen fixation at 92 degrees C by a hydrothermal vent archaeon. *Science*. 2006;314(5806):1783-6.
- Mendel RR, Bittner F.** Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763:621–635.
- Mergel A, Schnitz O, Mallmann T, Bothe H.** Relative abundance of denitrifying and nitrogen-fixing bacteria in layers of a forest-soil. *FEMS Microbiol Ecol*. 2001;36:33-42.

- Miyasaka NRS, Thuler DS, Floh EIS, Handro W, Toledo MBD, Gagiotti SM, Barbosa HR.** During stationary phase, *Beijerinckia derxii* shows nitrogenase activity concomitant with the release and accumulation of nitrogenated substances. *Microbiol Res.* 2003;158:309-315.
- Montagna E, Torres BB.** Expanding ecological possibilities: biological nitrogen fixation updated. *BAMBE*. 2008. 36(2):99-105.
- Moshiri F, Kim JW, Fu C, Maier RJ.** The FeSII protein of *Azotobacter vinelandii* is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen mediated inactivation of nitrogenase *in vitro* and *in vivo*. *Mol Microbiol.* 1994;14:101- 114.
- Murcia R, Rodelas B, Salmeron V, Pozo C, González-López J.** Effect of simazine on the production of lysine and methionine by *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Amino Acids.* 1997;12:249-255.
- Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ.** Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth Res.* 2005;83:135-150.
- Murphy KM, Teakle DS, Macrae JC.** Kinetics of colonization of adult Queensland fruit-flies *Bactrocera tryoni* by dinitrogen-fixing alimentary-tract bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:2508-2517.
- Nardi JB, Mackie RI, Dawson JO.** Could microbial symbionts of arthropod guts contribute significantly to nitrogen fixation in terrestrial ecosystems? *J Insect Physiol.* 2002;48:751–763.
- Narula NK, Lakshminarayana N, Tauro P.** Ammonia excretion by *Azotobacter chroococcum*. *Biotechnol Bioeng.* 1981;23, 767–770.
- Ogata H, Fujibuchi W, Goto S, Kanehisa M.** A heuristic graph comparison algorithm and its application to detect functionally related enzyme clusters. *Nucleic Acids Res.* 2000;28,4021–4028.
- Ohkuma M, Noda S, Kudo T.** Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(11):4926-4934.
- Ouzounis CA, Karp PD.** Global Properties of the Metabolic Map of *Escherichia coli*. *Genome Res.* 2000;10, 568–576.
- Pal C, Hurst LD.** Evidence against the selfish operon theory. *Trends Genet.* 2004;20, 232–234.
- Pati BR, Sengupta S, Chandra AK.** Studies on the amino acids released by phyllosphere diazotrophic bacteria. *Microbiol Res.* 1994;149, 287–290.
- Paula MA, Reis V, Döbereiner J.** Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potatoe (*Ipomoea batatas*), sugar cane (*Saccharum spp.*) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol Fertil Soils.* 1991;11:111-115.
- Pavlov AA, Kasting JF.** Mass-independent fractionation of sulfur isotopes in archean sediments: strong evidence for an anoxic archean atmosphere. *Astrobiology.* 2002;2:27–41.
- Petcu LG, Plaut GW.** NADPH-specific isocitrate dehydrogenase in regulation of urea synthesis in rat hepatocytes. *Biochem J.* 1980;190,581–592.
- Pierce VA, Crawford DL.** Phylogenetic analysis of glycolytic enzyme expression. *Science.* 1997;276:256-259.

- Pratte BS, Thiel T.** High-affinity vanadate transport system in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J Bacteriol.* 2006;188(2):464–468.
- Precht J, Kneip C, Lockhart P, Wenderoth K, Maier UG.** Intracellular sphaeroid bodies of *Rhopalodia gibba* have nitrogen-fixing apparatus of cyanobacterial origin. *Mol Biol Evol.* 2004;21(8):1477-1482.
- Prestwich KN, Ing NH.** The activities of enzymes associated with anaerobic pathways, glycolysis and the Krebs cycle in spiders. *Comp Bioch Physiol Part B.* 1982;72(2):295-302.
- Priscu JD, Fritsen CH, Adams EF, Giovannoni SJ, Paerl HW, McKay CP, Doran PT, Gordon DA, Lanoil BD, Pinckney JL.** Perennial antarctic lake ice: an oasis for life in a polar desert. *Science.* 1999;280:2095-2098.
- Prough RA, Culver JM, Fisher HF.** The mechanism of activation of glutamate dehydrogenase-catalyzed reactions by two different, cooperatively bound activators. *J Biol Chem.* 1973. 248:8528-8533.
- Ravasz E, Somera AL, Mongru DA, Oltvai ZN, Barabási AL.** Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science.* 2002. 297(5586):1551-1555.
- Raymond J, Siefert JL, Staples CR, Blankenship RE.** The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol.* 2004;21(3):541-554.
- Rees DC, Howard JB.** Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Op Chem Biol.* 2000;4:559–566.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T.** Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 1998;6(4)139-44.
- Rison SC, Teichmann SA, Thornton JM.** Homology, Pathway Distance and Chromosomal Localization of the Small Molecule Metabolism Enzymes in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 2002;318, 911–932.
- Robson RL, Postgate JR.** Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Ann Rev Microbiol.* 1980;34:183-207.
- Rösch C, Mergel A, Bothe H.** Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(8):3818-3829;
- Rubio LM, Ludden PW.** Maturation of Nitrogenase: a Biochemical Puzzle. *J Bacteriol.* 2005;187(2):405–414.
- Russell MJ, Martin W.** The rocky roots of acetyl-CoA pathway. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(7):358-363.
- Rutter MT, Zufall RA.** Pathway length and evolutionary constraint in amino acid biosynthesis. *J Mol Evol.* 2004;58:218-224.
- Rye R, Holland HD.** Paleosols and the evolution of atmospheric oxygen: A critical review. *Am J Sci.* 1998;298:621–672.
- Scherings G, Haaker H, Veeger C.** Regulation of nitrogen fixation by Fe-S protein II in *Azotobacter vinelandii*. *Eur J Biochem* 1977;77:621-630.
- Scherings G, Haaker H, Wassink H, Veeger C.** On the formation of an oxygen tolerant three component nitrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. *Eur J Biochem.* 1983;135:591-599.

- Schomburg I, Chang A, Schomburg D.** BRENDA, enzyme data and metabolic informations. *Nucl Acids Res.* 2002;30:47-49.
- Shethna YI, DerVartanian DV, Beinert H.** Non heme (iron.sulphur) proteins of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem Biophys Res Comm.* 1968;31:862-867.
- Simpson FB, Burris RH.** A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science.* 1984;224:1095-1096.
- Smith EL, Austen BM, Blumenthal KM, Nyc JF.** Glutamate dehydrogenases. In *The Enzymes*, (Boyer, P. D., ed.). Vol. 11, pp. 293–367, Academic Press, New York. 1975.
- Smith JM, Szathmáry E.** Major transitions in evolution. Oxford University Press. UK;1997.
- Smith TJ, Schmidt T, Fang J, Wu J, Siuzdak G, Stanley CA.** The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery. *J Mol Biol.* 2002. 318:765-777.
- Snel B, Bork P, Huynen MA.** The identification of functional modules from the genomic association of genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99,5890–5895.
- Snel B, Huynen MA.** Quantifying Modularity in the Evolution of Biomolecular Systems. *Genome Res.* 2004;14, 391–397.
- Snel B, van Noort V, Huynen MA.** Gene co-regulation is highly conserved in the evolution of eukaryotes and prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2004;32, 4725–4731.
- Soto-Urzúa L, Baca BE.** Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno. *Rev Latinoamer Microbiol.* 2001;43:37-49.
- Spirin V, Gelfand MS, Mironov AA, Mirny LA.** Metabolic network in the evolutionary context: multiscale structure and modularity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(26): 8774–8779 .
- Staal M, Meysman FJ, Stal JL.** Temperature excludes N<sub>2</sub>-fixing heterocystous cyanobacteria in the tropical oceans. *Nature.* 2003;425(6957):504-7.
- Steward GF, Jenkins BD, Ward BB, Zehr JP.** Development and testing of a DNA microarray to assess nitrogenase (nifH) gene diversity. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(3):1455–1465.
- Steward GF, Zehr JP, Jellison R, Montoya JP, Hellibaugh JT.** Vertical distribution of nitrogen-fixing phylotypes in a meromictic hypersaline lake. *Microbiol Ecol.* 2004;47:30-40.
- Strobel G, Daisy B.** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):491-502.
- Summons RL, Jahnke JH, Hope JM, Logan GA.** 2-Methyl-hopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature.* 1999;400:554–557.
- Tapia-Hernández A, Bustillos-Cristales MR, Jiménez-Salgado T, Caballero-Mellado J, Puentes-Ramírez LE.** Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbiol Ecol.* 2000;39:49-55.
- Thorneley RNF, Ashby GA.** Oxidation of nitrogenase iron protein by dioxygen without inactivation could contribute to high respiration rates of *Azotobacter* species and facilitate nitrogen fixation in other aerobic environments. *Biochem J.* 1989;261:181-187.
- Todd AE, Orengo CA, Thornton JM.** Plasticity of enzyme active sites. *Trends Biochem Sci.* 2002;27:419-426.

- Towe KM.** Environmental oxygen conditions during the origin and early evolution of life, *Adv Space Res.* 1996;18:7–15.
- Towe KM.** Evolution of nitrogen fixation. *Science.* 2002;295:798.
- Tsoka S, Ouzounis CA.** Functional versatility and molecular diversity of the metabolic map of *Escherichia coli*. *Genome Res.* 2001;11:1503-1510.
- Von Mering C, Zdobnov EM, Tsoka S, Ciccarelli FD, Pereira-Leal JB, Ouzounis CA, Bork P.** Quantitative assessment of protein function prediction from metagenomics shotgun sequences *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100,15428–15433.
- Wagner A, Fell DA.** The small world inside large metabolic networks . *Proc Biol Sci.* 2001;268, 1803–1810.
- Wahlund TM, Madigan MT.** Nitrogen fixation by the thermophilic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J Bacteriol.* 1993;175(2):474-478.
- Wang H, Norén A.** Metabolic regulation of nitrogen fixation in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem Soc Transac.* 2006;34:160-161.
- Waters JK, Hughes II BL, Purcell LC, Gerhardt KO, Mawhinney TP, Emerich DW.** Alanine, not ammonia, is excreted from N<sub>2</sub>-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:12038–12042.
- White D.** Inorganic Metabolism: nitrogen fixation. *in* The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes, 2<sup>nd</sup> edition, Oxford University Press, Oxford, UK; 2000.
- Wolfe DS.** Tales from the underground: a natural history of subterranean life. 2001. pp. 75–92. Perseus Books, New York.
- Yielding KL, Tomkins GM.** An effect of L-leucine and other essential amino acids on the structure and activity of glutamate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1961. 47: 983.
- Young JPW.** The phylogeny and evolution of nitrogenases. Palacios R, Newton WE, editors. Genomes and genomics of nitrogen fixing organisms, pp. 221-241. Springer, Netherlands, 2005.
- Zahran HH.** Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J Biotech.* 2001;91:143-153.
- Zahran HH.** *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(4):968-989.
- Zehr JP, Waterbury JB, Turner PJ, Montoya JP, Omoregie E, Steward GF, Hansen A, Karl DM.** Unicellular cyanobacteria fix N<sub>2</sub> in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature.* 2001;412(6847):635-638.
- Zheng Y, Anton BP, Roberts RJ, Kasif S.** Phylogenetic detection of conserved gene clusters in microbial genomes. *BMC Bioinformatics.* 2005;6, 243.
- Zheng Y, Szustakowski JD, Fortnow L, Roberts RJ, Kasif S.** Computational Identification of Operons in Microbial Genomes. *Genome Res.* 2002;12, 1221–1230.

## 7. Súmula curricular

### DADOS PESSOAIS

Nome: Erik Montagna

Local e data de nascimento: 31/10/1979, São Paulo, SP;

### EDUCAÇÃO

1. Colégio Objetivo, 1996.

2. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2003.

Bacharel em Farmácia e Bioquímica, modalidade Análises Clínicas.

### OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, CNPq, 06/2005 a 05/2007.

Professor Colaborador, Faculdades Oswaldo Cruz, desde 01/2008.

### PUBLICAÇÕES

**Montagna E, Torres BB.** Expanding ecological possibilities: biological nitrogen fixation updated. BAMBE<sub>d</sub>. 2008. 36(2):99-105. doi: 10.1002/bmb.20153.