

**Avaliação de parâmetros gênicos e proteicos *in silico* na soja (*Glycine max*) da GDP Manose 3'5' epimerase das vias Wolucka/Van Montagu e Wheeler/Smirnoff participante na biossíntese da vitamina C**

**Evaluation of *in silico* gene and protein parameters in soybean (*Glycine max*) of the GDP Mannose 3'5' epimerase of the Wolucka/Van Montagu and Wheeler/Smirnoff pathways participating in vitamin C biosynthesis**

DOI:10.34117/bjdv7n5-328

Recebimento dos originais: 07/04/2021

Aceitação para publicação: 03/05/2021

**Larissa Linhares Carvalho Mendes**

Universidade Estadual do Ceará, Curso de Ciências Biológicas  
E-mail: larissalcmendes@gmail.com

**Eliane Almeida de Lima**

Universidade Estadual do Ceará, Curso de Ciências Biológicas

**Micheline Soares Costa Oliveira**

Universidade Estadual do Ceará, Curso de Ciências Biológicas

**Luis Flávio Mendes Saraiva**

Universidade Estadual do Ceará, Curso de Ciências Biológicas  
E-mail: flavio.saraiva@uece.br

**RESUMO**

O ácido ascórbico não é sintetizado pelo organismo humano, sendo, portanto, indispensável a dieta. É considerada como uma substância de grande importância para a nutrição humana e está amplamente distribuída no reino vegetal, sendo que algumas frutas são consideradas fontes excepcionais. Esse metabólito possui um importante papel na fisiologia das plantas em relação a diferentes tipos de processos. A principal via biossintética nas plantas é a via Wheeler/Smirnoff que possui algumas enzimas possuidoras de isoformas, não havendo referências ante as diferenças de suas expressões gênicas. Assim, o conhecimento das sequências gênicas e proteicas favorece o início de um estudo mais aprofundado dessa via.

**Palavras-chave:** Ácido ascórbico, Enzima, Bioinformática, GDP Manose 3'5'epimerase

**ABSTRACT**

Ascorbic acid is not synthesized by the human body, and therefore diet is essential. It is considered a substance of great importance for human nutrition and is widely distributed in the vegetable kingdom, with some fruits being considered exceptional sources. This metabolite plays an important role in the physiology of plants in relation to different types of processes. The main biosynthetic pathway in plants is the Wheeler / Smirnoff pathway, which has some isoform-containing enzymes, with no reference to the

differences in their gene expressions. Thus, knowledge of gene and protein sequences favors the initiation of a more in-depth study of this pathway.

**Keywords:** Ascorbic Acid, Enzyme, Bioinformatics, GDP Mannose 3´5´epimerase

## 1 INTRODUÇÃO

A vitamina C não é sintetizada pelo organismo humano, sendo, portanto indispensável na dieta. Essa vitamina desempenha várias funções biológicas relacionadas ao sistema imune, formação de colágeno, absorção de ferro, inibição da formação de nitrosaminas e ação antioxidante, além de facilitar o uso do cálcio na construção dos ossos e vasos sanguíneos. Nos vegetais vários papéis são atribuídos ao ácido ascórbico, mas alguns se destacam como a fotoproteção, resposta a ferimentos, herbivoria de insetos, morte celular programada, respostas hormonais, florescimento, senescência e na expansão e divisão celular. Essa vitamina também possui um forte envolvimento no estabelecimento de respostas a diferentes estresses ambientais como seca alta salinidade, ozônio, radiação ultravioleta, altas temperaturas e elevadas intensidades luminosas. É considerada como uma substância de grande importância para a nutrição humana e está amplamente distribuída no reino vegetal, sendo que algumas frutas são consideradas fontes excepcionais, destacando-se a acerola, goiaba e o caju.

Diferentemente dos vegetais, algumas espécies de animais perderam a capacidade de síntese do ácido ascórbico, desse modo eles necessitam consumir em sua dieta fontes de vitamina C, tornando-se dependentes de organismos primários produtores como as plantas. A principal via biossintética nas plantas é a via Wheeler/Smirnoff. Das enzimas componentes dessa via, a GDP-D-Manose 3´5´epimerase é de grande importância e pode gerar dois produtos, dependendo da epimerização que faz.

A planta modelo é a soja (*Glycine max*), uma planta herbácea, dicotiledônea, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, gênero *Glycine* L. (GIESELER, 2013). Tem grande variedade genética, é influenciada pelo meio ambiente e tem grande importância para o Brasil, que é o segundo maior produtor mundial de soja, representando cerca de 23% da produção total. Representa um dos alimentos mais versáteis que o homem conhece, possuindo uma composição química com alto valor nutricional e compostos funcionais importantes na manutenção na saúde e redução de riscos de doenças crônico-degenerativas não transmissíveis.

## 2 OCORRÊNCIA E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DO ASCORBATO

O ascorbato está presente no citoplasma, mitocôndrias, cloroplastos, vacúolos, e da parede celular (ANDERSON, FOYER e WALKER, 1983; RAUTENKRANZ et al., 1994). A concentração de ácido ascórbico em cloroplastos pode ser elevada (até 50 mM em espinafre) e provavelmente possui um papel central no processo de fotossíntese (FOYER, 1993). A ocorrência na parede celular não é acidental, por exemplo, em cevada, há uma elevada concentração de carreadores de membrana plasmática possuidores de elevada afinidade, tanto para o ascorbato quanto para o deidroascorbato. O deidroascorbato (DHA) é a forma oxidada do ácido ascórbico, sendo transportado mais rapidamente que o ascorbato. Os transportadores de alta afinidade da membrana plasmática podem se presentes, facilitar o movimento do ascorbato na parede celular, permitindo a movimentação célula a célula via apoplasto.

Apesar de que o ácido ascórbico (vitamina C) seja uma molécula familiar quando se refere a sua importância dietética, a maioria dos aspectos de seu metabolismo e alguns aspectos de sua função nas plantas ainda não foram totalmente compreendidos. Um desses pontos está relacionado a sua síntese. Os seres humanos e alguns outros animais (inclusive outros primatas) dependem do ascorbato em sua dieta por causa da perda de função da última enzima envolvida na via de síntese, chamada L-gulonolactona oxidase.

O ácido ascórbico tem um papel central no processo de fotossíntese, evidenciado pela alta concentração presente nos cloroplastos. Ele funciona em três modos de atuação: primeiramente, atua como antioxidante pela remoção do peróxido de hidrogênio (quando há carência de catalase), formado pela fotorredução do oxigênio presente no fotossistema I (reação de Mehler), reação catalizada pela peroxidase do ascorbato ou PA (MIYAKE e ASADA, 1992). Em segundo lugar, o monodeidroascorbato (MDA), formado pela PA, pode atuar como um aceptor de elétrons direto do fotossistema I (MIYAKE e ASADA, 1992; FOYER e LELANDAIS, 1993). O terceiro modo de atuação bioquímica se refere a função de cofator para epoxidase de violaxantina. A zeaxantina é formada por sucessivas reações de epoxidação da xantofila. A epoxidase, que está ligada no lado do lúmen da membrana do tilacóide é dependente do ascorbato como cofator para seu funcionamento (NEUBAUER e YAMAMOTO, 1992, 1993). Desse modo o ascorbato contribui para o fluxo de elétrons e formação da zeaxantina que é um agente fotoprotetor.

Esse envolvimento do ascorbato na fotossíntese já tinha sido reconhecido há algum tempo e foi revisado recentemente com ênfase na fotoproteção (SMIRNOFF 2000; NOCTOR e FOYER, 1998; ASADA, 1999; NIYOGI 1999). Possíveis papéis para o ácido ascórbico no processo de fotossíntese foram sugeridos por Arnon e colegas no início de 1950 (MARRE et al., 1959; FORTI e JAGENDORF 1961; MAPSON, 1962). Inicialmente, um papel de transportador de elétrons foi considerado, mas mais tarde foi aceito como um agente protetor. Para o conhecimento atual dos papéis do ascorbato na fotossíntese foi previamente anunciado por Marre et al., (1959) que os cloroplastos podem oxidar ambos, ascorbato a monodehidroascorbato (MDA) e MDA para reduzir o ácido ascórbico, sendo estes processos dependentes da quebra da água e do fluxo de elétrons. Eles também sugeriram para isso o envolvimento da enzima monodehidroascorbate reductase. Forti e Jagendorf (1961) mostraram que o ácido ascórbico estimula a fotofosforilação e permite o transporte de elétrons, atuando cataliticamente na reação de Mehler. Mapson (1962) mostrou que o ácido ascórbico está sujeito a foto-oxidação e a ambas, oxidação e redução do dehidroascorbato, foram inibidas pelo bloqueio do transporte de elétrons.

Mais tarde, quando os detalhes do transporte de elétrons foram mais claramente compreendidos, ficou claro que o ácido ascórbico e a glutathione nos cloroplastos são oxidados por peróxido de hidrogênio produzido pela reação de Mehler e que a redução das suas formas oxidadas utiliza um redutor do fotossistema I (PS I) (FOYER e HALLIWELL, 1976; ANDERSON et al., 1983; ASADA, 1999). O conhecimento atual dos papéis do ascorbato na fotossíntese pode ser resumido como:

- a) A eliminação do peróxido de hidrogênio catalisada pela peroxidase do ascorbato (APX);
- b) Eliminação direta do superóxido, radicais hidroxila e oxigênio singlete;
- c) Regeneração de radicais  $\alpha$ -tocoferol produzidos quando o  $\alpha$ -tocoferol reduz os radicais peroxil lipídicos;
- d) Doação de elétrons para o fotossistema II (PS II) por ácido ascórbico presente no lúmen;
- e) Cofator da violaxantina de-epoxidase (VDE) envolvida na dissipação de zeaxantina dependente de energia de excitação em excesso.

Oxidantes formados durante a fotossíntese (ASADA, 1999) podem ser eliminados não enzimaticamente, enquanto a redução do peróxido de hidrogênio também é catalisada pela APX possuidora de isoformas estromais e ligadas ao tilacóide

(ASADA 1999). O peróxido de hidrogênio é formado a partir de dismutação do superóxido, que em si é produzido por redução de oxigênio, seja via ferredoxina reduzida (reação de Mehler) ou do PS II (CLELAND e GRACE 1999). O principal produto de oxidação do ascorbato relativamente estável é o radical monodeidroascorbato (MDA). Em alguns casos é detectada após a iluminação com luz brilhante, mas é particularmente importante depois da imposição de estresse oxidativo pela adição de paraquat, ultravioleta B (UVB) e estresse por seca (HEBER et al 1996). É provável que a importância do ácido ascórbico como um eliminador de radicais livres depende da relativa estabilidade do radical MDA: os radicais thilil, formados quando grupos tióis, como a glutatona eliminam os radicais livres, são mais reativos e mais relativamente perigosos (STURGEON et al., 1998). O radical MDA dismuta a ascorbato e deidroascorbato. Normalmente, o total de ascorbato em folhas e cloroplastos está 90% reduzido e isso é conseguido através de sistemas que reduzem o MDA e deidroascorbato (DHA) de volta a ácido ascórbico.

### 3 BIOSÍNTESE DO ÁCIDO ASCÓRBICO

Evidências apresentadas por Isherwood, Chen e Mapson (1953) indicavam que a síntese do ácido ascórbico *in vivo*, tanto em plantas quanto em animais poderiam ser representadas por uma ou ambas das seguintes sequências:

- 1- D-glicose → D-glucurono-1,4-lactona → L-gulono- 1,4- lactona → ácido L-ascórbico;
- 2- D-galactose → ácido D-galacturônico metil ester → L-galactono- 1,4-lactona → ácido L-ascórbico.

Pelo menos quatro rotas são cogitadas até o presente momento, sendo que duas são bem definidas em plantas, entretanto, diferem enormemente a cada espécie. Por vezes apenas uma é cogitada, em outros casos mais de uma está presente. As rotas biossintéticas acabam por formar compostos que precedem a síntese do ascorbato. Nesse ponto se destacam inicialmente aquelas que envolvem a participação da L-galactose e GDP-L-gulose, do D-galacturonato, e do mio-inositol, considerados como intermediários propostos na biossintese do ácido ascórbico, indicando que parte da via animal também pode estar presente em plantas. As quatro moléculas citadas representam suas rotas de biossintese.

A biossintese de ácido ascórbico a partir de D-glicose foi relatada pela primeira vez em ratos. Ele pode ser sintetizado *de novo* na rota do ácido hexurônico do fígado ou

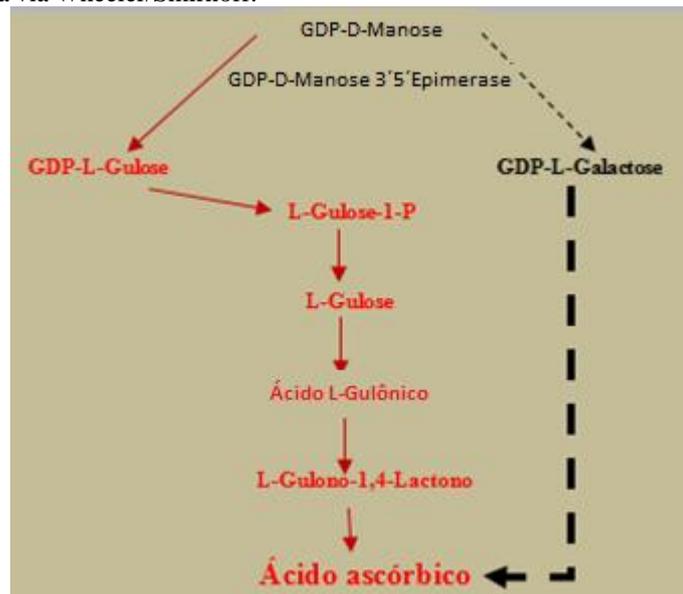
do rim de espécies através da atividade da L-gulonolactona oxidase. No entanto, os seres humanos, os primatas não humanos e alguns outros mamíferos não podem sintetizar o ácido ascórbico, porque o gene que codifica a L-gulonolactona oxidase, a enzima que catalisa o último passo na biossíntese, foi altamente mutada se tornando não funcional nessas espécies.

Mais recentemente, foi demonstrado que a expressão ectópica do gene da L-gulonolactona oxidase recuperou o teor de ácido ascórbico em folhas em cinco *Arabidopsis* mutantes (VTC) que eram deficientes em ácido ascórbico (RADZIO, 2003). Isto significa que ou a enzima L-gulonolactona oxidase presente em ratos usa L-galactonolactona como substrato, ou que o substrato real, L-gulonolactona, está sendo produzido em *Arabidopsis*. Como a produção de L-galactonolactona é reduzida no mutante *vtc1*, a segunda possibilidade parece mais provável. Isso pode indicar que uma via alternativa está presente em plantas que podem contornar algumas etapas que envolvem a via da D-manose (VALPUESTA e BOTELLA, 2004).

Esse contorno se inicia através da atividade de outra enzima, a GDP-Manose 3',5'-epimerase, que pode catalizar a conversão de GDP-D-Manose em GDP-L-Gulose, por epimerização 5' ou formar GDP-L-Galactose por epimerização 3',5', gerando no primeiro caso uma via biossintética denominada rota Wolucka/Van Montagu ou via da L-Gulose (WOLUCKA e VAN MONTAGU, 2003) (Figura 1).

Esses dois caminhos aparentemente ocorrem nas plantas, sendo que o "desvio" que gera GDP-L-Gulose é menos frequente ou ausente em algumas espécies. Soma-se o fato que a L-Gulose é um açúcar extremamente raro, sendo supostamente um componente não estrutural em plantas (WOLUCKA E VAN MONTAGU, 2003).

Figura 1. Em vermelho a Via biossintética do ácido ascórbico proposta por Wolucka/Van Montagu. À esquerda em preto a via Wheeler/Smirnoff.



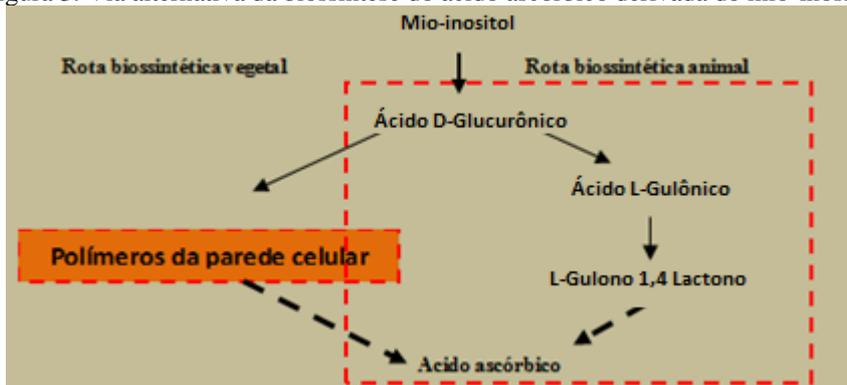
A parede celular das células vegetais também pode ser um ponto de partida para a síntese do ácido ascórbico. Alguns dos diferentes polímeros que a compõem são fontes de compostos que recentemente foram encontrados participando do processo biossintético. Particularmente um desses compostos, o ácido D-galacturônico, pode ser utilizado para desencadear uma via que culmina com a produção do ascorbato (Figura 2). Esse conjunto de reações parece estar envolvido em tecidos em que a parede celular está em um processo degradativo ou de elevado grau de desenvolvimento. Segundo Radzio et al., (2003), diferentemente da via da D-Manose (GDP-L-Gulose e GDP-L-galactose) que prioritariamente se apresenta em tecidos foliares, a via do ácido D-Galacturônico aparece mais frequentemente nos frutos em desenvolvimento. Desse modo, outro caminho biossintético proposto em plantas inclui o ácido D-galacturônico como um precursor metabólico, gerando como precursor imediato da L-galactono-1,4-lactona o ácido L-galactônico (DI MATTEO et al., 2010). Segundo Agius et al (2002) a superexpressão do gene da enzima ácido D-galacturônico redutase (GalUR) em *Arabidopsis thaliana* elevou o teor de vitamina C de duas a três vezes, demonstrando a viabilidade do aumento nos níveis de vitamina C em plantas utilizando esse gene, comprovando que o mesmo faz parte da biossíntese gerando o precursor da L-galactono-1,4-lactona.

Figura 2. Via biossintética derivada do ácido D-Galacturônico



Outra rota biossintética leva em consideração um intermediário até então desconhecido, o mio-inositol (Figura 3). Esse intermediário da via biossintética do ácido ascórbico nos animais, o ácido D-glucurônico, pode ser produzido pela ação de uma mio-inositol oxigenase, mas esta possibilidade ainda não havia sido cogitada e analisada em plantas. A partir do momento que foi disponibilizada a seqüência genômica completa de Arabidopsis foi propiciado aos pesquisadores procurar genes da mio-inositol oxigenase na planta, homólogos aquele existente em porcos. Como resultado foram encontradas quatro sequencias de leitura aberta nos cromossomos 1, 2, 4 e 5, que posteriormente, após refinamentos na busca documental da proteína indicou que a região codificante está presente no cromossomo 4 de Arabidopsis (VALPUESTA e BOTELLA, 2004).

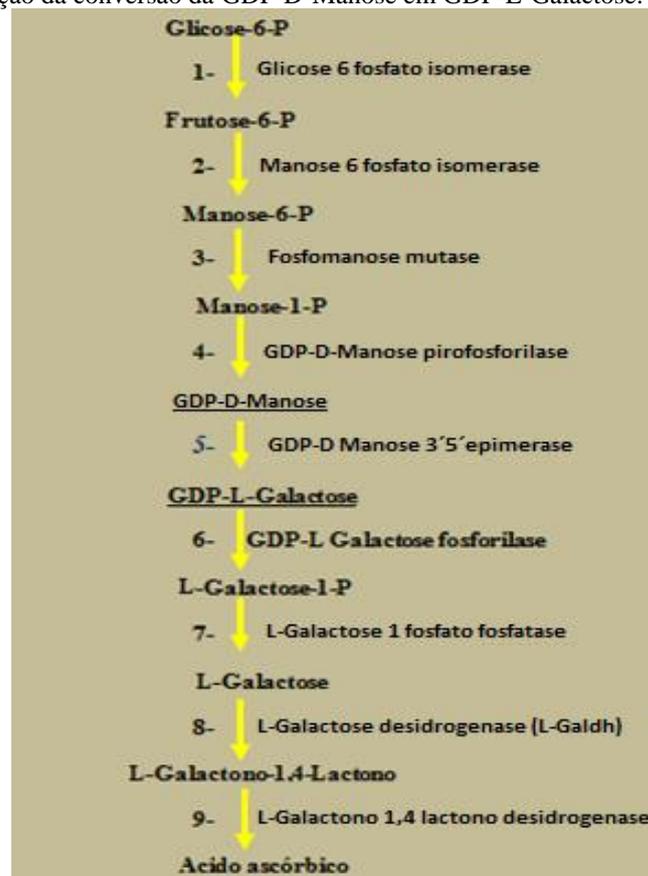
Figura 3. Via alternativa da biossíntese do ácido ascórbico derivada do mio-inositol.



Finalmente, em 1998, fundamentado em novas evidências bioquímicas uma nova via foi proposta para a síntese do ácido ascórbico nas plantas, que combinava dois fatos: a não inversão do esqueleto de carbono e a ocorrência da L-galactono-1,4-lactona como o precursor. Essa via envolve a conversão do GDP-D-manose em GDP-L-galactose catalisada por uma manose GDP-3,5-epimerase. A L-galactose liberada a

partir do nucleotídeo é o precursor imediato da L-galactono-1,4-lactona, que, por ação de uma desidrogenase é convertida em ácido ascórbico. A via da galactose como foi definida devido a participação desse composto, teve nos trabalhos de Wheeler et al (1998) uma descrição mais completa da rota biossintética do ácido L- ascórbico (Figura 4). Aparentemente a L-galactono-1,4-lactona é o precursor direto do ácido ascórbico. Seu precursor é a L-galactose, que é oxidado a L-galactono-1,4-lactona dependente de uma NADH-L-galactose desidrogenase. A L-galactono-1,4-lactona é oxidada a ácido ascórbico catalizada pela ação da L-galactono-1,4-lactona desidrogenase. Recentemente, alguns pontos divulgados relativos a síntese do ascorbato auxiliaram ainda mais no entendimento do processo biossintético. Uma observação inicial, com a proposta desta via era que L-Galactose (L-Gal) aplicada de forma exógena resultava em um grande aumento no pool total de ácido ascórbico existente nos tecidos da planta similar àquela causada pela L-Galactono 1,4-lactono (GalL). Para explicar a conversão da L-Galactose em L-Galactono 1,4-lactono uma nova enzima, a NAD L-galactose desidrogenase, foi detectada oxidando L-Gal no C1 para formar GalL. A L-Galactose é proveniente da GDP-D-Manose, gerada por um processo de dupla epimerização no C3 e C5. A enzima responsável, a GDP-D-Manose 3'5' - epimerase não tem, até o presente momento, dados que foi purificada ou clonada, sendo que sua atividade de epimerase foi recentemente confirmada em ervilhas e nos extratos de *A. thaliana*. Além da GDP-L-Galactose (GDP-L-Gal), os produtos da reação da GDP-D-Manose (GDP-D-Man) incluem também L-Galactose-1-P (L-Gal-1-P) e L-Galactose (L-Gal). Como muito pouca D-manose e D-manose-1-P são formadas, isto sugere que existem enzimas específicas que sequencialmente executam a formação de L-Gal-1-P e L-Gal oriundas de GDP-L-Gal. Já a GDP-D-Manose é formada a partir de GTP e D-Manose-1-P pela ação da GDP-D-Manose pirofosforilase. O AA é, portanto, um produto que até então era de desconhecida importância do metabolismo da D-Manose.

Figura 4. Via Wheeler/Smirnof da biossíntese do ácido ascórbico em plantas, também conhecida por Via da galactose, em função da conversão da GDP-D-Manose em GDP-L-Galactose.



Assim, pode-se verificar que a GDP- Manose 3'5' Epimerase é fundamental não apenas importante para uma, mas serve a duas rotas biossintéticas da vitamina C em plantas, pois bifurca a conversão de GDP-D-Manose em GDP-D-Gulose ou GDP-L-Galactose, respectivamente nas vias Wolucka/Van Montagu e/ou Wheeler/Smirnof.

#### 4 OBJETIVOS

Descrever as variações existentes no âmbito do polimorfismo gênico da GDP- Manose 3'5' Epimerase em soja (*Glicine max*), bem como PCR semi quantitativa como avaliação primária da expressão gênica comparada ao agente constitutivo fator de alongação alfa;

Avaliar a existência e número de isoformas da GDP- Manose 3'5' Epimerase em soja (*Glicine max*);

Montar a árvore filogenética para da GDP- Manose 3'5' Epimerase em soja (*Glicine max*) e

Elaborar a resolução da estrutura tridimensional da GDP- Manose 3'5' Epimerase em soja (*Glicine max*).

## 5 MATERIAL E METODOLOGIA

### 5.1 MATERIAL VEGETAL

Plântulas de soja (*Glycine max*) foram semeadas em campo, onde folhas jovens de plantas saudáveis foram coletadas manualmente no campo experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa, no município de Pacajús a 50 Km de Fortaleza no estado do Ceará. Esse material foi coletado as 10 horas da manhã, onde o material vegetal foi imediatamente colhido, cortado e congelado em nitrogênio líquido.

### 5.1 ANÁLISES GENÔMICAS

Para as análises de polimorfismo genômico foram utilizadas plataformas online, bancos de dados genômicos (Phytozome e NCBI) e software de alinhamento (Clustal Omega).

### 5.2 DESCRIÇÕES DAS VARIAÇÕES DA SEQUENCIA PRIMÁRIAS E MONTAGEM DE ÁRVORE FILOGENÉTICA

A sequência primária da enzima GDP-D-Manose 3'5' epimerase obtida da espécie modelo *Arabidopsis thaliana* no NCBI foi submetidas à ferramenta de bioinformática Phytozome em *Glycine max*. O algoritmo de busca TblastN foi usado, disponibilizando o rastreo no genoma da soja a(s) sequencia(s) A partir disso, foram feitas coletas das sequencias de cada gene, bem como das respectivas sequencias proteicas, para análises comparativas da enzima em *Glycine max* usando o próprio Phytozome, bem como o Clustal Omega para observar possíveis variações. A submissão da(s) sequencia(s) na ferramenta de bioinformática MEGA, foi usada para a descrição de variações presentes em cada gene, bem como nas sequencias primárias da proteína e descrição de árvore filogenética.

### 5.3 MONTAGEM DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA GDP-D-MANOSE 3'5' EPIMERASE

Para montagem da estrutura tridimensional da proteína foi usada a plataforma de modelagem 3D Modelling do SwissProt (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>).

## 5.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA GDP-D-MANOSE 3'5' EPIMERASE

### 5.4.1 Extração do RNA total.

Foram utilizadas 200 mg de folhas jovens de soja, *Glicine max*, semeadas em campo, sendo colhidas após a planta atingir um mês pós emergência das folhas, sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida foram cortados pequenos pedaços e macerados em nitrogênio líquido. O isolamento do RNA total foi feito com o uso do kit comercial RNeasy plant Mini kit® (Quiagen) seguindo o protocolo do fabricante. O eluído, o RNA total, foi posteriormente armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$  para subsequentes análises eletroforéticas e RT-PCR. A concentração e integridade do RNA foram avaliadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose 1,5%.

### 5.4.2 Quantificação do RNA total

A quantificação e verificação da pureza dos RNAs foram realizadas por medidas de absorvância em 230, 260 e 280 nm e suas respectivas relações  $^{260}/_{230}$  na qual devem ser superiores a 2,0 e  $^{260}/_{280}$  na qual devem ficar no intervalo entre 1,7 e 2,0, utilizando um espectrofotômetro da marca PHARMACIA BIOTECH, modelo ULTROSPEC 2000 e confirmadas em um Nanodrop 2000c da marca Thermo Scientific.

### 5.4.3 Eletroforese do material amplificado

Os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,5%, diluído em tampão TBE 1X, para observação das bandas correspondentes aos fragmentos amplificados da GDP Manose 3'5'Epimerase. Foram aplicados no gel 5  $\mu\text{l}$  da amostra amplificada por PCR junto com 1  $\mu\text{l}$  de azul de bromofenol. No mesmo gel foi também aplicado o marcador (100 Base-Par Ladder - PHARMACIA BIOTECH DO BRASIL). A eletroforese foi realizada em aparelho da marca PHARMACIA, modelo GNA 100 (7.5x10cm), utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua BIO RAD (Power - pac 300) com amperagem constante 50 mA por aproximadamente 1 hora à temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . O gel foi corado com brometo de etídio (1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), seguindo de visualização em fotodocumentador modelo Mini Bis Pro da Bio-imaging Systems.

### 5.4.4 Reação em cadeia da polimerase

Pares de primers específicos foram montados gerando um amplicon de 324pb, com 92 °C de desnaturação, 53 °C de anelamento e 72 °C de extensão em 30 ciclos (Tabela 1).

Tabela 1. Pares de primers específicos usados na análise da expressão gênica e genes da GDP-D-Manose-3,5-Epimerase por PCR semiquantitativa.

Primer	5' Sequencia 3'
GDP-Manose 3'5'epimerase senso (GME-F)	TGATTGAGGCTGCCAGG
GDP-Manose 3'5'epimerase antisenso (GME-R)	CGACAAAAAGCAGCAGG

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 ANÁLISES GENÔMICAS

A submissão da sequencia primária da GDP-Manose 3'5'epimerase de *Arabidopsis thaliana* na plataforma Phytozome possibilitou visualizar que os genes em *Glycine max* estão em número de cinco. Presentes nos cromossomos 3, 10, 19 e 20, sendo que no cromossomo 19 foram encontrados dois genes. A estrutura polimórfica dos genes evidenciada demonstra a presença de 6 éxons (Figura 5).

Figura 5. Sequencias gênicas da GDP- Manose 3'5' Epimerase de *Glycine max* descritas na plataforma Phytozome, revelando a presença de 5 genes dispostos em quatro cromossomos.



## 6.2 ALINHAMENTO E FILOGENIA DAS SEQUENCIAS PRIMÁRIAS DA GDP MANOSE 3'5' EPIMERASE EM SOJA (*GLYCINE MAX*).

O alinhamento das sequencias primárias da GDP Manose 3'5' Epimerase constantes nos cromossomos mostraram poucas variações em sua composição, sendo que os cromossomos 10 e 20 apresentam regioes de maior identidade que os demais, podendo sugerir uma possível família multigênica determinante de isoformas, bem como a proximidade filogenética constante entre as isoformas (Figuras 6 e 7).

Figura 6. Sequencias proteicas da GDP- Manose 3'5' Epimerase de *Glycine max* descritas na plataforma M.E.G.A., revelando a presença de 5 proteínas sendo que dois grupos podem ser identificados, um dos cromossomos 3 e 19 (duas sequencias) e o outro grupo dos cromossomos 10 e 20.

```
#MEGA
  DataType=Protein GDP Manose 3'5'Epimerase
  NSeqs=5 NSites=376
  Identical= . Missing=? Indel=-:

#Glyma.03G247000.1 MSISGTTDYG SPTYQNLERE PYWPSEKLRI SITGAGGFIA SHIARRLKTE GHYIIASDNK KNEHMTEGMP CHEFHLVDLR
#Glyma.10G162000.1 ..S.A.R.... AY..E..... ..K..... ..V..... ..N..... ..D.....
#Glyma.19G244600.1 ..S..... AY..... ..D.....
#Glyma.19G244700.1 ..S..... AY..... ..D.....
#Glyma.20G224400.1 ..S.A.G.... AY..E..... ..K..... ..D.....

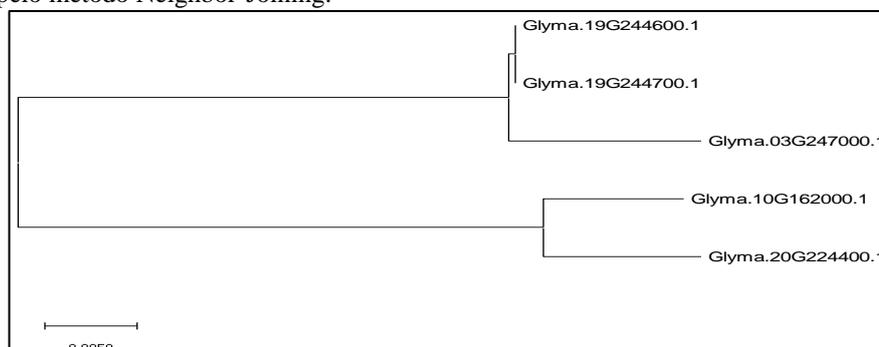
#Glyma.03G247000.1 VMDNCLIVTK GVDHVFNLAA DMGGMGFIQS NHSVIMYNT MISFNIEAA RINGVERFFPY ASSACIYPEF KQLEINVLK
#Glyma.10G162000.1 .....K..... ..I.....
#Glyma.19G244600.1 .....K..... ..I.....
#Glyma.19G244700.1 .....K..... ..I.....
#Glyma.20G224400.1 ..N...K..E..... ..I.....

#Glyma.03G247000.1 ESDANPAEPQ DAYGLEKLAT EELCKHYNKD FGIECRIGRF HNIYGFYGTW KGGREKAPAA FCRKTLISKD RFEMWGDGLQ
#Glyma.10G162000.1 .....F..... ..VI..T.....
#Glyma.19G244600.1 .....F..... ..VI..T.....
#Glyma.19G244700.1 .....F..... ..VI..T.....
#Glyma.20G224400.1 .....F..... ..VI..S.....

#Glyma.03G247000.1 TRSFTFIDEC VEGVLRLLTKS DFREFVNIQS DEMVSMNEMA EIVLSFEDKN IPIYHIPGPE GVRGRNSDNT LIKEHLGNAP
#Glyma.10G162000.1 .....I.G..N... ..H.....
#Glyma.19G244600.1 .....I.G..N... ..H.....
#Glyma.19G244700.1 .....I.G..N... ..H.....
#Glyma.20G224400.1 .....I.G..N... ..H.....

#Glyma.03G247000.1 TMKLDGLRI TYFWIREQLE KEKAEGVDLS GYGSSKVQQT QAPVQLGSLR AADGKE
#Glyma.10G162000.1 ..R..... ..I.....Q.I.I.V.....
#Glyma.19G244600.1 ..R..... ..I.....Q.I.I.V.....
#Glyma.19G244700.1 ..R..... ..I.....Q.I.I.V.....
#Glyma.20G224400.1 ..R..... ..I.....Q.I.I.V.....
```

Figura 7. Sequencias proteicas da GDP- Manose 3'5' Epimerase de *Glycine max* descritas na plataforma M.E.G.A., revelando a proximidade dos dois grupos, um composto pelos cromossomos 3 e 19 (duas sequencias) e o outro grupo dos cromossomos 10 e 20. O mecanismo histórico evolucionário histórico usado foi pelo método Neighbor-Joining.

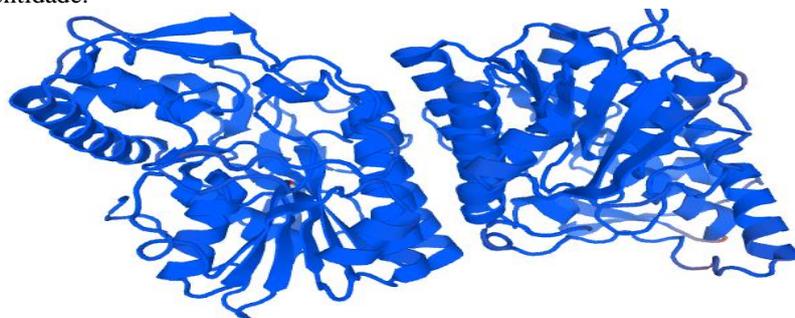


## 7 ESTRUTURA 3D DA GDP- MANOSE 3'5' EPIMERASE

Avaliando as características gerais da GDP- Manose 3'5' Epimerase, observou-se que a enzima possui em *Glycine max* 376 resíduos de aminoácidos na estrutura primária. A estrutura tridimensional revelou que a mesma é composta por um homo

dímero, apresentando diversidade intra e inter espécie (Figura 8). Esse fato sugere que a enzima é composta por isoformas, ainda não classificadas na literatura, pertencendo provavelmente a uma família multigenica.

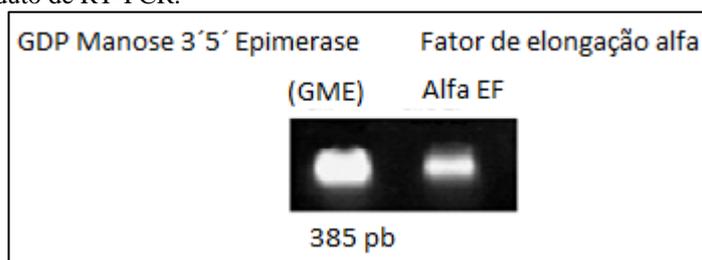
Figura 8. Estrutura tridimensional da GDP- Manose 3'5' Epimerase de *Glycine max*, obtida do algoritmo Modelling do Swiss Prot (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>), evidenciando o homo dímero, com 99.73% de identidade.



## 8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA GDP- MANOSE 3'5' EPIMERASE DE *GLYCINE MAX*.

A expressão gênica da GDP-Manose 3'5' epimerase pôde ser observada através dos níveis de transcritos, sendo que a expressão foi superior ao elemento constitutivo fator de alongação alfa. Não foram discriminadas as expressões específicas para cada gene.

Figura 9. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR da GDP- Manose 3'5' Epimerase, comparada ao elemento constitutivo Fator de Elongação Alfa de *Glycine max*. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR.



## 9 CONCLUSÕES

Segundo Smirnoff et al (1998), ancorado em evidências bioquímicas, uma nova via foi proposta para a síntese do ácido ascórbico nas plantas. Essa via, Wheeler/Smirnoff, envolve a conversão de GDP-D-manose em GDP-L-galactose catalisada pela GDP-D- Manose 3,5-epimerase. Atuando no primeiro passo específico na biossíntese de vitamina C, a desempenhar um papel importante na regulação da vitamina C e biossíntese da parede celular/glicoproteínas. Entretanto foi observado que

há famílias multigênicas, diante disso, o conhecimento das sequências gênicas e suas isoformas favorecem o início de um estudo mais aprofundado dessa via e a definição do papel de cada isoforma. Foram encontrados em genes da enzima GDP-Manose 3,5-epimerase nos cromossomos 19, 20, 10 e 03 de *Glycine max*, contudo, no cromossomo 19 foi observado a presença de uma duplicação, indicando que pode existir uma família multigênica para essa enzima.

Quanto ao polimorfismo em suas isoformas, foram encontrados respectivamente 6 éxons nos genes. E a porcentagem de conservação no número de aminoácidos idênticos é de aproximadamente 13%. A estrutura tridimensional revelou a presença de um homodímero e a análise da expressão gênica comparada ao fator de alongação alfa demonstrou elevada expressão indicando que em condições de campo há indícios que a biossíntese da vitamina C em soja seja dependente da GDP Manose 3´5´Epimerase.

## REFERÊNCIAS

- AGIUS F.; LAMOTHE R.G.; CABALLERO J.L.; BLANCO J.M.; BOTELLA M.A.; VALPUESTA V. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. **Nat Biotech** 21: 177–181, 2003.
- ANDERSON J.W.; FOYER C.H.; WALKER D.A. Light-dependent reduction of dehydroascorbate and uptake of exogenous ascorbate by spinach chloroplasts. **Planta** 158: 442-450, 1983.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **A. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biol.** 50, 601-639, 1999.
- CLELAND, R. E.; GRACE, S. C. Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II. **FEBS Letters** 457, 348-352, 1999.
- DI MATTEO, A.; SACCO, A.; ANACLERIA, M.; PEZZOTTI, M. DELLEDONNE, M.; FERRARINI, A.; FRUSCIANTE, L.; BARONE, A. The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. **BMC Plant Biology**, 2010.
- FORTI, G.; JAGENDORF, A. T. Photosynthetic phosphorylation in the absence of redox dyes: oxygen and ascorbate effects. **Acta Biochimica Biophysica.** 54, 322-330, 1961.
- FOYER, C. H. Ascorbic acid. In: Alscher RG, Hess JL, eds. **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, 31-58, 1993.
- FOYER, C. H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta** 133, 21-25, 1976.
- FOYER, C. H.; LELANDAIS, M. The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis. In: Yamamoto HY, Smith CM, eds. *Photosynthetic responses to the environment*. Rockville, Maryland: **American Society of Plant Physiologists**, 88-101, 1993.
- GIESELER, P. R.; **USO DE FERTILIZANTE CORRETIVO NA LINHA DE SEMEADURA E A LANÇO NA CULTURA DA SOJA.** 2013. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Agronomia da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2013.
- HEBER, U.; MIYAKE, C.; MANO, J.; OHNO, C.; ASADA, K. Monodehydroascorbate radical detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy is a sensitive probe of oxidative stress in intact leaves. **Plant Cell Physiology** 37, 1066-1072, 1996.
- HOAGLAND DR; ARNON DI. **The waterculture method for growing plants without soil.** Berkeley, CA: Agric. Exp. Stn., Univ. of California. 1950.
- ISHERWOOD, F.A.; CHEN, Y.T.; MAPSON, L.W. Synthesis of L-ascorbic acid in plants and animals. *Biochemistry Journal.* 56, 1–21, 1953.

MAPSON, L. W. Photo-oxidation of ascorbic acid in leaves. **Biochemistry Journal**. **85**, 360-369, 1962.

MARRE, E.; ARRIGONI, O.; ROSSI, G. Ascorbic acid and photosynthesis. II. Anaerobic photo-oxidation of ascorbic acid by chloroplast fragments and by whole chloroplasts. **Biochimica.Biophysica Acta** 36, 56-64, 1959.

MIYAKE, C.; ASADA, K. Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product, monodehydroascorbate radicals in the thylakoids. **Plant and Cell Physiology** 33: 541-553, 1992.

NEUBAUER, C.; YAMAMOTO, H.Y. Mehler-peroxidase reaction mediates zeaxanthin formation and zeaxanthin-related fluorescence quenching in intact chloroplasts. **Plant Physiology** 99: 1354-1361, 1992.

NEUBAUER, C.; YAMAMOTO, H.Y. The role of ascorbate in the related ascorbate peroxidase, violaxanthin de-epoxidase and non-photochemical fluorescence-quenching activities. In: Yamamoto HY, Smith CM, eds. *Photosynthetic responses to the environment*. Rockville, Maryland: **American Society of Plant Physiologists**, 166-171, 1993.

NIYOGI, K. K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology**. **50**, 333-359, 1999.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology** 49, 249-279, 1998.

RADZIO, J. A.; LORENCE A.; CHEVONE B.I.; NESSLER C.L. L-Gulonolactone oxidase expression rescues vitamin C-deficient Arabidopsis vtc mutants. **Plant Molecular Biology** 53, 837-844, 2003.

RAUTENKRANZ, A.A.F; LI, L.; MACHLER, F.; MARTINOIA, E.; OERTLI, J.J. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.cv Gerbel) leaves. **Plant Physiology** 106: 187-193, 1994.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Current Opinion Plant Bioogy**. **3**, 229-235, 2000.

STURGEON, B. E.; SIPE, H. J.; BARR, D. P.; CORBETT, J. T.; MARTINEZ, J. G.; MASON, R. P. The fate of the oxidizing tyrosyl radical in the presence of glutathione and ascorbate: implications for the radical sink hypothesis. **Jounal Biology Chemistry**. 273, 30116-30121, 1998.

VALPUESTA, V.; BOTELLA, M.A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: New pathways for an old antioxidant. **Trends in Plant Science**. p.573-574, 2004.

VERNETTI, F. J.; GASTAL, M.F.C. Descrição botânica da soja. In: Circular Técnica, Pelotas: Embrapa, v. 7, 1979.

WHEELER, G.L.; JONES, M.A.; SMIRNOFF, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature** 393, 365–369, 1998.

WOLUCKA, B.A.; VAN MONTAGU M. GDP-mannose-3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. **Journal Biology Chemistry** 278: 47483–47490, 2003.