

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE
AQUAPORINAS DE SOJA (*Glycine max*) E SEU ENVOLVIMENTO NO
METABOLISMO DE UREIA

Angela Menegassi

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências.

Orientação: Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Coorientação: Fernanda Stanisquaski

Supervisão doutorado-sanduíche: Maria da Graça Tavares Soveral Rodrigues

Porto Alegre

Maio de 2015

Instituições e Fontes Financiadoras

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Proteínas Tóxicas (LAPROTOX), Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Transporte Biológico, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.

As fontes financiadoras foram: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CPNq), responsável pela concessão de bolsa de doutorado no Brasil, e Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), responsável pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche em Portugal.

Banca Examinadora

Dra. Helenice Mercier
Universidade de São Paulo, Brasil.

Dr. Felipe dos Santos Maraschin
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Dra. Márcia Maria Auxiliadora Naschenveng Pinheiro Margis
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Dr. Raul Antonio Sperotto
Unidade Integrada Vale do Taquari de Ensino Superior, Brasil.
Membro suplente da banca examinadora.

Dr. Rafael Real Guerra
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
Revisor da tese.

Agradecimentos

Desde o primeiro dia em que comecei a escrever a tese, deixei essas páginas em branco, reservadas para os meus agradecimentos. As semanas passaram, terminei o texto, o trabalho foi revisado... e essas páginas continuavam em branco. Confesso, muitas vezes considerei a ideia de deletá-las. Não porque eu não me sinta grata. Não porque eu não tenha a quem agradecer. Pelo contrário!

Preciso agradecer à Célia pela oportunidade, por me receber de volta no laboratório depois de um período de ausência e pela confiança em mim depositada. E à Fernanda, a quem eu não tenho coragem de chamar de “co-orientadora”, porque foi muito mais do que isso. Foi até mais do que uma orientadora desse trabalho. Preciso agradecer por estares sempre do meu lado, por todo o apoio que tu me deste, por compartilhares, não só teu conhecimento, mas tua amizade comigo. Não posso esquecer também do meu querido revisor, Rafael, que me ajudou muito não somente nesses últimos dias, mas em vários momentos ao longo desses quatro anos, com dicas e novas ideias sempre que precisei.

Me sinto grata à professora Graça, que me recebeu em seu laboratório em Lisboa com todo o carisma e atenção que eu poderia querer e à Paula por me ensinar pacientemente uma nova técnica e por todo o apoio. Estive a aprender imenso lá em Lisboa e devo isso a todas as raparigas do laboratório, que, “eh pá”, são bué fixes, muito porreiras! Se me faltasse a amizade de vocês, eu certamente não teria me apaixonado pela cidade e não levaria essa saudade do tempo em que estive a viver nela.

Como não agradecer aos amigos que fiz no Laprotox? Eu tenho certeza de que vocês não têm a menor noção do quanto me ajudaram ao longo desses anos. Cada palavra e cada abraço estão marcados em mim e eu levo para sempre, com um carinho enorme. Rodrigo, obrigada pela tua colaboração e paciência com as mil perguntas que eu te fiz, por me ensinar as coisas duas ou três vezes quando eu pedia! E pelas risadas todas! E à Angela, que me acompanha desde muito antes do Laprotox... há 12 anos, amiga... ainda bem que a gente só rejuvenesce e essa amizade só se fortalece!

É claro que eu preciso agradecer à minha família, que eu posso resumir em uma só palavra: amor. Preciso agradecer especialmente aos meus pais, Milton e Dina, que conseguem cumprir o papel de pai e mãe com maestria e, de quebra, cumprem o de

melhores amigos também. A relação que a gente tem é única; todo esse amor, que só aumenta, faz de mim quem eu sou.

Eu tenho tanto a agradecer a esses e a tantos outros amigos, que são parte da minha vida e fazem com que eu me sinta iluminada por ter a oportunidade de conviver com tanta gente especial... Mas, mesmo sendo imensamente grata a todas essas pessoas, ainda pensei em deletar essas páginas. Ainda me custa escrever essas palavras. Porque vocês não merecem só duas páginas de agradecimentos. Comparadas à gratidão que sinto, por cada um de uma maneira especial, essas palavras parecem generalistas e vazias. É pouco. Mas as páginas ficam, para que eu possa registrar: minha gratidão e meu carinho vão chegar a cada um de vocês da forma mais sincera, como um abraço apertado e a garantia de que vocês podem contar com a minha amizade sempre.

Índice

i – Lista de Abreviaturas.....	8
ii – Resumo.....	9
iii – Abstract.....	10
1. Introdução	
1.1. Descoberta das Proteínas Intrínsecas de Membrana.....	11
1.2. Estrutura Geral das Aquaporinas.....	12
1.3. Aquaporinas Vegetais.....	15
1.4. Fertilização Nitrogenada.....	18
1.5. Metabolismo da Ureia.....	20
2. Justificativa e Objetivos.....	24
3. Materiais e Métodos	
3.1. Identificação dos Genes de Aquaporinas em Soja.....	25
3.2. Análise de Sequência das Aquaporinas de Soja.....	25
3.3. Predição da Localização Subcelular.....	25
3.4. Modelagem Molecular por Homologia e Análise Estrutural.....	26
3.5. Plantas de Soja e Tratamentos.....	26
3.6. Extração de RNA e Síntese de cDNA.....	27
3.7. Análise da Expressão Gênica.....	27
3.8. Leveduras e Meios de Cultura.....	30
3.9. Clonagem dos Genes de Aquaporinas em Leveduras.....	31
3.10. Complementação Funcional em Levedura.....	32
3.11. Espectroscopia de fluorescência (<i>stopped-flow</i>).....	33
4. Resultados e Discussão	
Parte I – Identificação e Caracterização Estrutural das Aquaporinas de Soja	
4.1.1. Identificação das Aquaporinas no Genoma da Soja.....	36

4.1.2. Escolha do Molde para Modelagem Comparativa.....	44
4.1.3. Análise Estrutural das Aquaporinas de Soja.....	46
Parte II – Caracterização Funcional de Quatro Aquaporinas de Soja	
4.2.1. Predição da Permeabilidade e Localização Subcelular.....	54
4.2.2. Ensaio de Estresse Osmótico.....	58
4.2.3. Ensaio de Toxicidade.....	59
4.2.4. Quantificação do Transporte de Água.....	61
4.2.5. Quantificação do Transporte de Ureia.....	64
4.2.6. Análise das Especificidades Estabelecidas para as Aquaporinas de Soja.....	66
Parte III – Envolvimento das Aquaporinas no Metabolismo de Ureia	
4.3.1. Envolvimento das Aquaporinas no Metabolismo de Ureia.....	72
5. Conclusões e Perspectivas.....	81
6. Referências Bibliográficas.....	83
7. Apêndices	
Apêndice 1.....	95
Apêndice 2.....	97

i – Lista de Abreviaturas

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico complementar)
CFDA	Diacetato de 5-(6-)Carboxifluoresceína
E_a	Energia de Ativação
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
k	Constante de Velocidade do Processo
MIP	<i>Major Intrinsic Protein</i>
MTP	Metaloprotease Dependente de Zinco
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIP	<i>Nodulin-26-like Intrinsic Protein</i> (proteína intrínseca do tipo nodulina-26)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PDB ID	<i>Protein Data Base Identification</i>
P_f	Coefficiente de Permeabilidade Osmótica da Água
P_s	Permeabilidade do Solute
PIP	<i>Plasma Membrane Intrinsic Protein</i> (proteína intrínseca de membrana plasmática)
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase quantitativa)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucleico)
SDPs	<i>Specificity Determining Positions</i> (posições determinantes de especificidade)
SIP	<i>Small Intrinsic Protein</i> (proteína intrínseca pequena)
TIP	<i>Tonoplast Intrinsic Protein</i> (proteína intrínseca de tonoplasto)
UreEB	Urease Embrião-Específica
UreU	Urease Ubíqua
XIP	<i>X Intrinsic Protein</i> (proteína intrínseca X)
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

ii – Resumo

Aquaporinas, também conhecidas como *Major Intrinsic Proteins* (MIPs), são proteínas de membrana distribuídas em todos os domínios da vida, responsáveis pelo transporte de água e pequenos solutos. Em plantas superiores, essa família é particularmente diversa e pode ser classificada em cinco subfamílias: proteínas intrínsecas de membrana plasmática, proteínas intrínsecas de tonoplasto, proteínas intrínsecas do tipo nodulina-26, proteínas intrínsecas pequenas e proteínas intrínsecas X. Esses canais apresentam uma estrutura bastante conservada, exibindo, no centro do poro, duas regiões importantes para a seletividade: os motivos NPA e o filtro seletivo. No presente trabalho, sessenta e seis genes de aquaporinas foram identificados no genoma da soja e classificados por homologia de sequência nas cinco subfamílias estabelecidas. As estruturas tridimensionais das MIPs de soja foram determinadas por modelagem comparativa e o raio dos poros e os resíduos importantes para a especificidade foram identificados. Ensaio funcionais utilizando expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* foram realizados para quatro aquaporinas, GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 e GmNIP2;2, demonstrando que esses genes codificam canais funcionais capazes de transportar água, peróxido de hidrogênio e ureia. A ureia possui um papel muito importante na agricultura por ser o fertilizante nitrogenado mais utilizado mundialmente. A identificação de transportadores de ureia em plantas ainda é recente e, além de um transportador específico, somente as aquaporinas estão relacionadas ao transporte de ureia em plantas. Apesar disso, a relevância fisiológica desse transporte pelas MIPs é ainda motivo de debate. Empregando uma abordagem baseada em PCR quantitativo, foi demonstrado que os níveis de expressão de GmTIP1;9, GmTIP3;2 e GmNIP2;2, mas não de GmTIP2;5, são alterados em raízes de soja cultivada em solução nutritiva contendo ureia como a única fonte de nitrogênio. Além disso, os níveis dos transcritos de GmNIP2;2 são aumentados na parte aérea das plantas, indicando o possível envolvimento dessa aquaporina na redistribuição de ureia nos tecidos. Outros genes de aquaporinas de soja também apresentaram maior expressão nessas condições. Esses resultados sugerem o envolvimento de aquaporinas no metabolismo de ureia em plantas e apontam essas proteínas como potenciais alvos para manipulação genética visando o aumento da eficiência do uso de nitrogênio em sistemas adubados com ureia e a melhoria da produção agrícola.

iii – Abstract

Aquaporins, also known as Major Intrinsic Proteins (MIPs), are membrane proteins distributed in all kingdoms of life, responsible for water and small solutes transport. In higher plants, this family is particularly diverse and can be classified into five subfamilies: plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), tonoplast intrinsic proteins (TIPs), nodulin-26-like intrinsic proteins (NIPs), small basic intrinsic proteins (SIPs) and X intrinsic proteins (XIPs). These channels present a highly conserved structure, displaying, in the center of the pore, two regions important for selectivity: the NPA motifs and the selective filter. In the present work, sixty-six aquaporin genes were identified in soybean genome and classified by sequence homology into the five established subfamilies. The three-dimensional structure of soybean MIPs was determined by homology modeling and the pore radius and residues influencing substrate specificity were identified. Functional assays using heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* were performed for four aquaporins, GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 and GmNIP2;2, indicating that these genes codify functional channels capable of transporting water, hydrogen peroxide and urea. Urea plays an important role in agriculture because it is the most used nitrogen fertilizer worldwide. Plant urea transporters are just beginning to be identified and, to date, besides a specific transporter, only aquaporins are linked to urea transport in plants. Nevertheless, the physiological relevance of this transport is still in debate. Using a quantitative PCR approach, we have shown that the expression levels of three urea transporting MIPs, GmTIP1;9, GmTIP3;2 and GmNIP2;2, but not GmTIP2;5, are altered in soybean roots when urea is the sole nitrogen source. Moreover, transcript levels of GmNIP2;2 were also up-regulated in shoots, indicating the possible involvement of this aquaporin in urea redistribution to other plant tissues. Several other soybean aquaporin genes were up-regulated in this condition as well. Taken together, these results suggest the involvement of aquaporins in urea metabolism in plants and place these proteins as potential targets for plant manipulation to improve urea based nitrogen use efficiency and crop production.

1. Introdução

1.1. Descoberta das Proteínas Intrínsecas de Membrana

Até meados do século XX, acreditava-se que a difusão através das camadas lipídicas fosse a única maneira de a água ser transportada através das células. Gradativamente, evidências surgiram para que a comunidade científica passasse a suspeitar que poderiam existir canais de água de origem proteica inseridos em algumas membranas celulares. Entre essas evidências, estava a alta permeabilidade à água de eritrócitos quando comparada a outras células, a redução dessa permeabilidade quando da exposição a reagentes que continham mercúrio e a associação entre o aumento na permeabilidade à água de tecidos do trato urinário com o aparecimento de agregados de proteínas na membrana plasmática (Knepper e Nielsen 2004). Foi somente em 1988 que o grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Peter Agre isolou uma proteína denominada CHIP28 (*channel-forming integral membrane protein of 28 kDa*) de eritrócitos e células renais (Denker *et al.* 1988). Quatro anos depois, essa proteína foi caracterizada como um canal de água em oócitos de *Xenopus laevis* (Preston *et al.* 1992) e renomeada para Aquaporina-1 (AQP1), representando o primeiro canal de água descrito e o primeiro membro da grande família das Proteínas Intrínsecas de Membrana (MIPs, *Major Intrinsic Proteins*). Em 2003, Agre ganhou o prêmio Nobel em química por “descobertas referentes a canais em membranas celulares”, reconhecimento pela importância dessa descoberta que provocou uma revolução em diversas áreas do conhecimento, como biofísica de permeação de água, fisiologia do transporte de fluidos, biologia estrutural de proteínas de membrana e fisiopatologia de desordens relacionadas ao equilíbrio hídrico (Knepper e Nielsen 2004).

Nas últimas décadas, MIPs foram identificadas em todos os reinos da vida, desde archaea, bactérias e fungos até plantas e animais superiores. Em mamíferos, além da AQP1, foram identificados outros 12 membros dessa família. Além disso, uma série de outros substratos para esses canais vêm sendo revelados, como óxido nítrico (Wang e Tajkhorshid 2010), ácido láctico (Choi e Roberts 2007), glicerol, ureia, peróxido de hidrogênio e arsenito (Wu e Beitz 2007). É importante salientar que o termo “aquaporina” continua sendo utilizado para denominar todos os integrantes dessa família de proteínas, mesmo quando o transporte de água é realizado com baixa eficiência.

1.2. Estrutura Geral das Aquaporinas

A família das MIPs é uma das famílias de proteínas de membrana mais bem caracterizadas estruturalmente, devido à relativa facilidade de sua aplicação em estudos estruturais por cristalografia de raios X (Gonen e Walz 2006). Existem 14 estruturas de aquaporinas resolvidas, dentre as quais podemos citar o facilitador de glicerol (GlpF) de *Escherichia coli* (Fu *et al.* 2000), a AQP1 bovina (*Bos taurus*; Sui *et al.* 2001), a AQPZ de *E. coli* (Savage *et al.* 2003), a AQPM da arqueobactéria *Methanothermobacter marburgensis* (Lee *et al.* 2005), a AQP4 de rato (*Rattus norvegicus*; Hiroaki *et al.* 2006), a AQP2 humana (*Homo sapiens*; Frick *et al.* 2014) e a SoPIP2;1 de espinafre (*Spinacea oleracea*), sendo essa a única de origem vegetal (Törnroth-Horsefield *et al.* 2006). Todas as aquaporinas até hoje caracterizadas agrupam-se na membrana como tetrâmeros e a composição desses tetrâmeros pode determinar o direcionamento das aquaporinas para a membrana plasmática (Zelazny *et al.* 2007).

Independentemente da função que apresentam e do organismo do qual provêm, as aquaporinas compartilham uma estrutura geral comum e possuem massa aproximadamente entre 23-31 kDa. Tal estrutura é formada por 6 domínios transmembrana conectados por 5 alças, sendo as extremidades N e C terminal voltadas para a porção citoplasmática (Fig. 1). A estrutura primária pode ser dividida em duas metades similares, chamadas hemiporos, que provavelmente foram originadas por duplicação gênica durante a evolução (Gomes *et al.* 2009).

Na estrutura tridimensional, os dois hemiporos ficam de frente um para o outro, em orientação inversa na membrana (Fig. 2A), formando o chamado “modelo ampulheta” (Jung *et al.* 1994). No centro do poro ficam os motivos NPA (asparagina-prolina-alanina), altamente conservados, formando duas pequenas hélices hidrofóbicas que ficam de frente uma pra outra e contribuem para a formação do canal e seletividade do substrato (Fig. 2B). Outra região bastante importante na determinação da especificidade aos substratos é chamada filtro seletivo e é formada pela interação de quatro resíduos de aminoácidos localizados nas hélices 2 (H2) e 5 (H5) e na alça E (LE1 e LE2), como indica a figura 2C. Na estrutura tridimensional, o filtro seletivo aparece logo acima dos motivos NPA (Fig. 2B), sendo essas duas regiões normalmente as mais estreitas do poro dessas proteínas.

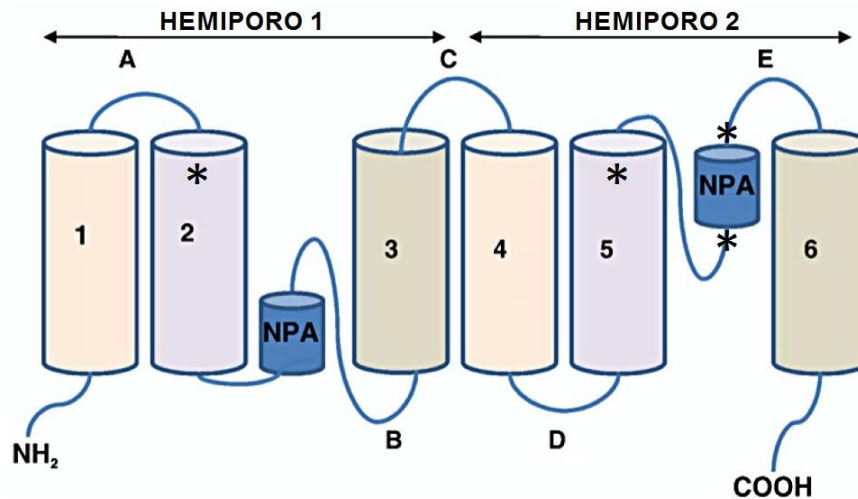


Figura 1. Topologia geral das aquaporinas. Os números representam as hélices transmembrana e as letras, as alças. Os asteriscos (*) indicam a localização aproximada de cada resíduo formador do filtro seletivo. Adaptado de Gomes *et al.* (2009).

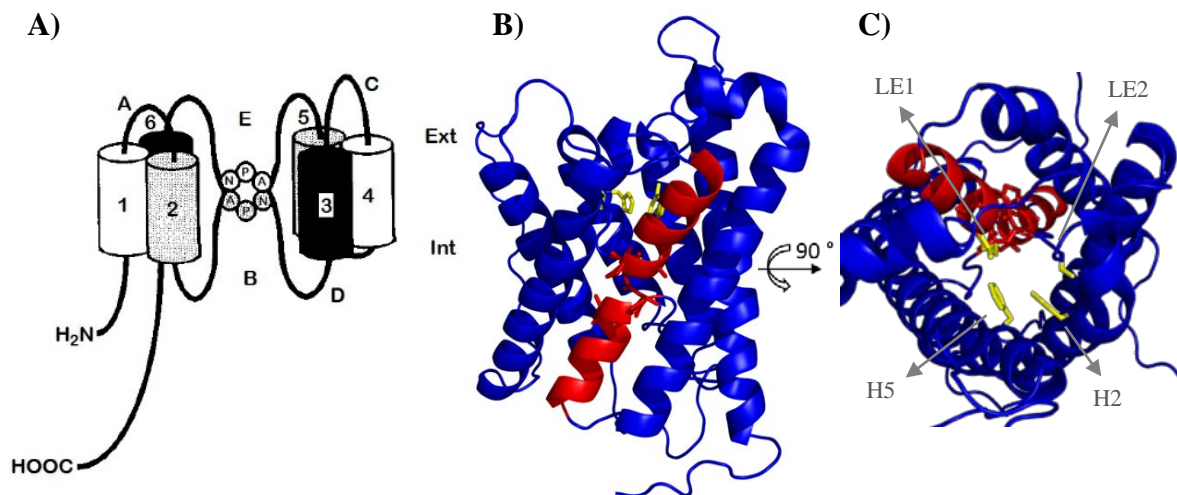


Figura 2. Estrutura tridimensional das aquaporinas. **A)** Modelo ampulheta. Int=intracelular; Ext=extracelular. Adaptado de Jung *et al.* (1994). **B)** Modelo tridimensional indicando a localização dos motivos NPA (vermelho) e dos resíduos formadores do filtro seletivo (amarelo). **C)** Vista do modelo tridimensional perpendicular à bicamada lipídica, a partir do vestíbulo extracelular. A posição de cada aminoácido do filtro seletivo está indicada (H5, hélice 5; H2, hélice 2; LE1 e LE2, alça E posições 1 e 2). As imagens B e C foram geradas com o PyMOL Molecular Graphics System.

Variações nas seqüências desses dois pontos de constrição constituem um fator determinante na seletividade das aquaporinas. Os mecanismos de seleção dos substratos baseiam-se no tamanho, carga e polaridade das moléculas. A figura 3 mostra a

variabilidade da composição dos filtros seletivos que pode ser encontrada em aquaporinas e indica como essas diferenças podem influenciar na seletividade do poro.

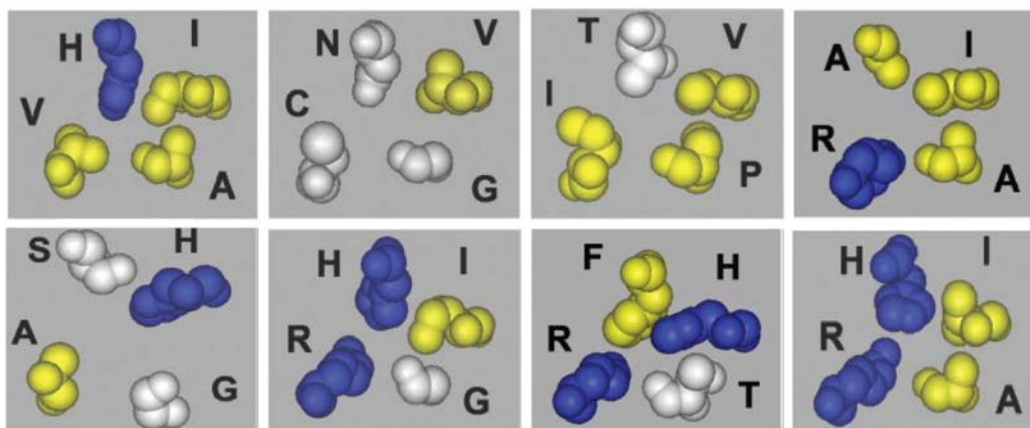


Figura 3. Representação dos filtros seletivos de MIPs de *Arabidopsis thaliana*. Ao lado de cada resíduo aparece a letra representativa do aminoácido. As cadeias laterais estão coloridas de azul para básico hidrofílico, amarelo para hidrofóbico e branco para hidrofílico neutro. O filtro em cada projeção é visto de maneira perpendicular ao plano da membrana, a partir do vestíbulo extracelular. Adaptado de Wallace e Roberts (2004).

Através de ensaios de mutação em aquaporinas vegetais, foi demonstrado que a substituição de um aminoácido do filtro seletivo pode alterar o perfil de seletividade do canal (Azad *et al.* 2012). Em aquaporinas de tulipa (*Tulipa gesneriana*), a substituição de um resíduo de isoleucina por um de arginina em LE2 bloqueia a passagem de peróxido de hidrogênio e ureia. Porém, o filtro seletivo representa apenas um dos níveis de seleção das aquaporinas. Em *Arabidopsis thaliana*, aquaporinas específicas para água foram mudadas de maneira a apresentar os mesmos resíduos de aminoácidos identificados nos filtros seletivos de outras aquaporinas que transportavam ureia e amônio. Apesar das mutações, a seletividade não foi modificada, indicando que outras regiões da proteína devem ser importantes para a seleção dos substratos (Dynowski *et al.* 2008).

Os motivos NPA, por serem altamente conservados entre as aquaporinas, são comumente utilizados para identificação de novas sequências de MIPs. Porém, como revisado por Ishibashi (2006), as aquaporinas podem apresentar um ou ambos motivos NPA menos conservados, com diferentes composições de aminoácidos, como Asn-Pro-Cys, Asn-Pro-Leu, Ser-Pro-Ala, Ser-Pro-Leu, Asn-Thr-Cys, entre outras. Estudos sugerem que variações nas sequências dos motivos NPA são importantes para a seletividade,

exclusão de cátions, expressão e estabilidade estrutural das aquaporinas (Hove e Bhave 2011; Wree *et al.* 2011)

Na tentativa de inferir a função das aquaporinas a partir da sua sequência primária, diferentes grupos de pesquisa vêm procurando outros resíduos de aminoácidos e motivos a partir dos quais seja possível prever a seletividade do canal. Através de alinhamentos, Froger *et al.* (1998) identificaram cinco resíduos, chamados P1-P5, localizados no primeiro e sexto segmentos transmembrana e na alça E, capazes de distinguir entre aquaporinas ortodoxas (específicas para o transporte de água) e gliceroporinas (capazes de transportar solutos pequenos, como o glicerol). Esses cinco aminoácidos são conhecidos coletivamente como “posições de Froger” (*Froger’s positions*) e sua importância foi validada para uma aquaporina do inseto *Cicadella viridis* através modificação de dois desses sítios, o que causou alteração na sua permeabilidade ao glicerol (Lagrée *et al.* 1999).

Recentemente, com o uso do servidor online SDPpred (<http://bioinf.fbb.msu.ru/SDPpred>), Hove e Bhave (2011) estabeleceram as chamadas posições determinantes de especificidade (SDPs) para aquaporinas. As SDPs variam em localização dependendo da molécula em questão, de maneira que diferentes posições determinantes são identificadas para cada substrato (amônia, ácido bórico, peróxido de hidrogênio, etc.).

Apesar dos avanços na acurácia da predição dos substratos transportados pelas MIPs, ainda é necessária a confirmação experimental para comprovar sua especificidade e, em alguns casos, não existe uma correlação clara entre tais sequências e o tamanho ou natureza das moléculas carregadas.

1.3. Aquaporinas Vegetais

Em plantas, as aquaporinas exibem alta multiplicidade de isoformas. Dados genômicos estabeleceram o número de genes de aquaporinas em 35 para *A. thaliana* (Johanson *et al.* 2001), 34 para arroz (*Oryza sativa*; Sakurai *et al.* 2005; Nguyen *et al.* 2013), 23 para videira (*Vitis vinifera*; Sheldon *et al.* 2009), 47 para o tomateiro (*Solanum lycopersicum*; Reuscher *et al.* 2013), 41 para batata (*Solanum tuberosum*; Venkatesh *et al.* 2013) e 53 para a couve chinesa (*Brassica rapa*; Tao *et al.* 2014).

Com base em homologia de sequência, as aquaporinas de plantas vasculares podem ser classificadas em cinco subfamílias: Proteínas Intrínsecas de Membrana Plasmática

(PIPs, *Plasma membrane Intrinsic Proteins*), Proteínas Intrínsecas de Tonoplasto (TIPs, *Tonoplast Intrinsic Proteins*), Proteínas Intrínsecas do tipo Nodulina-26 (NIPs, *NOD26-like Intrinsic Proteins*), Proteínas Intrínsecas Pequenas (SIPs, *Small basic Intrinsic Proteins*) e Proteínas Intrínsecas X (XIPs, *X Intrinsic Proteins*), sendo essas últimas recentemente descobertas e ainda sem função conhecida (Li *et al.* 2014). Apesar de os nomes de algumas subfamílias remeterem a localizações subcelulares, essa associação nem sempre é verdadeira, de maneira que PIPs já foram localizadas no cloroplasto (Uehlein *et al.* 2008) e TIPs na membrana plasmática (Gattolin *et al.* 2011), por exemplo.

Além da classificação em subfamílias, análises filogenéticas permitem uma classificação ainda mais detalhada das MIPs, em subgrupos. A subfamília PIP, por exemplo, pode ser dividida em dois subgrupos, PIP1 e PIP2. A subfamília TIP pode ser dividida em TIP1, TIP2, TIP3, TIP4 e TIP5. A nomenclatura de aquaporinas vegetais individuais é baseada nessa classificação: cada nome consiste basicamente do subgrupo ao qual a aquaporina pertence, seguido de ponto e vírgula e da ordem em que ela aparece no dendrograma resultante da análise filogenética, como, por exemplo, TIP1;1, TIP1;2, NIP4;3, etc. (Fig. 4). Duas letras representativas da espécie em que foram encontradas podem preceder o nome dessas proteínas; é utilizado, por exemplo, Gm para *Glycine max*, At para *Arabidopsis thaliana* e Vv para *Vitis vinifera*.

O traslado das aquaporinas para as diferentes membranas celulares representa um dos níveis de regulação da sua atividade (Zelazny *et al.* 2007; Verdoucq *et al.* 2014). A expressão de cada gene de aquaporina também é regulada durante o desenvolvimento de maneira tecido-específica e modulada por diversos fatores de estresse ambiental (Maurel *et al.* 2008). Além disso, as MIPs têm sua atividade regulada por modificações pós-traducionais, heterodimerização e controle de abertura e fechamento do canal, por exemplo, por variações de pH (Törnroth-Horsefield *et al.* 2006) e pressão de turgor (Leitão *et al.* 2014). Ainda que o volume de estudos acerca das aquaporinas vegetais tenha crescido muito na última década, a relevância desses canais para a sobrevivência das plantas no ambiente em que vivem está apenas começando a ser compreendida (Ludewig e Dynowski 2009). Estudos sobre as diferentes funções das aquaporinas em plantas têm sido limitados, em parte, pela alta diversidade genética desses organismos e pelas dificuldades metodológicas para mensurar o transporte através dessas proteínas (Maurel 2007). Não obstante, já existem evidências de que as aquaporinas participam dos mais variados

processos fisiológicos, como reprodução, desenvolvimento e germinação de sementes, expansão celular, condutividade hidráulica das raízes, resposta a estresses bióticos e abióticos, simbiose rizóbio-leguminosa, nutrição vegetal, entre outros (revisado por Maurel *et al.* 2008; Gaspar 2011; Li *et al.* 2014).

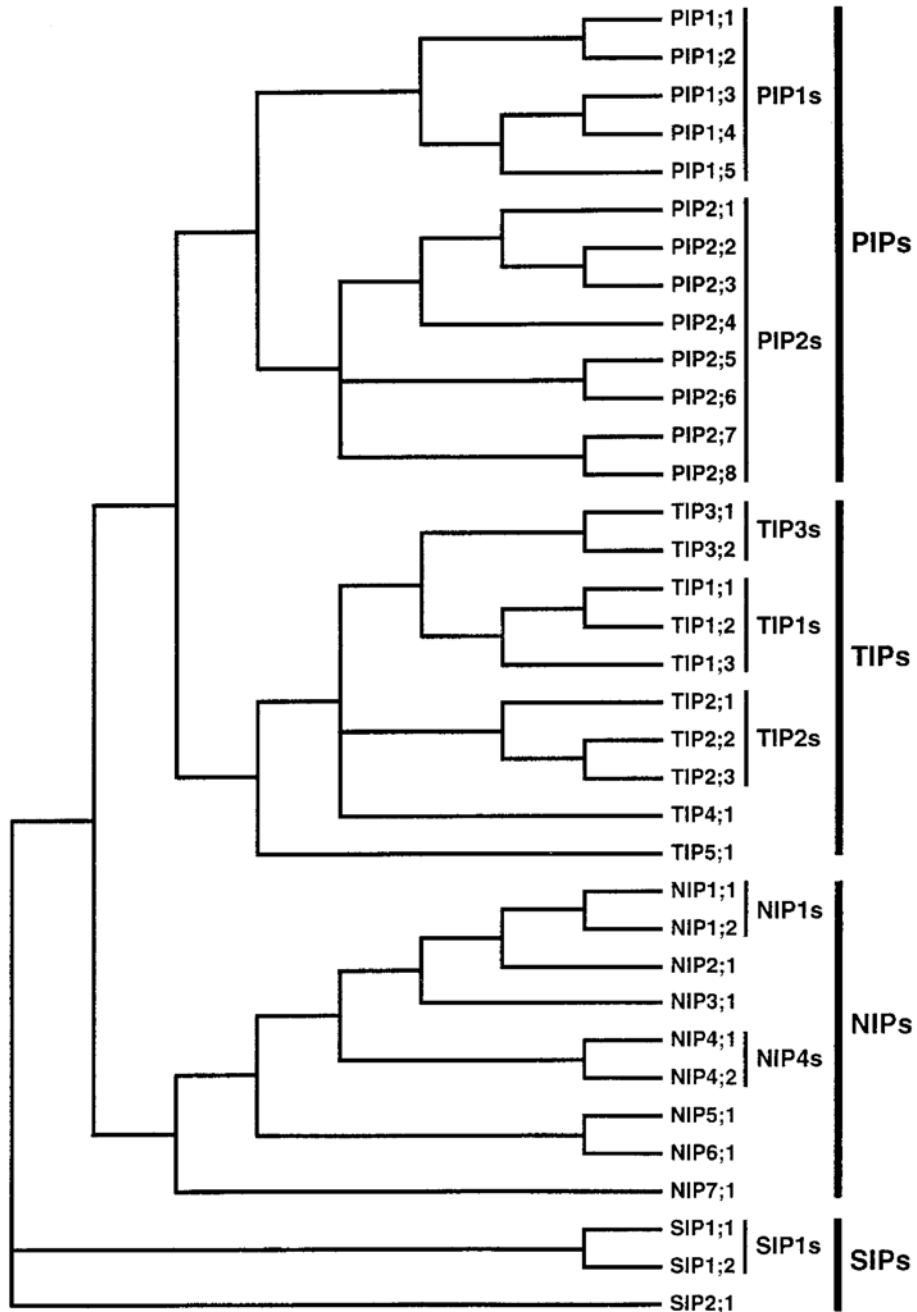


Figura 4. Dendrograma das aquaporinas de Arabidopsis, adaptado de Johanson *et al.* (2001).

1.4. Fertilização Nitrogenada

O nitrogênio é um nutriente essencial para as plantas, fundamental nos mais diversos processos biológicos por ser componente de ácidos nucleicos, proteínas e cofatores. A baixa disponibilidade desse nutriente no solo limita o crescimento e desenvolvimento vegetal e, conseqüentemente, o rendimento agrícola (Gutiérrez 2012). Para manter a produtividade, é necessário o uso de fertilizantes para repor o nitrogênio removido do solo pela própria colheita, pela volatilização e pela lixiviação. Dentre todos os fertilizantes a base de nitrogênio, a ureia é o de maior consumo, representando cerca de metade do total de fertilizantes nitrogenados utilizados no mundo (<http://faostat3.fao.org>; dados de 2002). A preferência pela ureia deve-se a uma combinação de vantagens: ela possui alto conteúdo de nitrogênio, baixo custo de produção, apresenta uma taxa de transformação mais lenta à nitrato (a forma mais sujeita à lixiviação) por microrganismos e sua degradação no solo pode ser retardada pela adição de inibidores de urease (Kojima *et al.* 2006). Entretanto, a efetiva utilização de fertilizantes nitrogenados pelas plantas é pouco eficiente, raramente ultrapassando os 50% (Hungria *et al.* 2001). Assim, praticamente metade dos fertilizantes nitrogenados aplicados à cultura são perdidos, seja por lixiviação, transformação em formas gasosas ou desnitrificação, o que gera danos econômicos e ambientais expressivos por agregar altos custos ao cultivo e liberar grandes quantidades de amônia tóxica e óxidos no meio ambiente (Wang *et al.* 2008).

A importância do nitrogênio para a produtividade agrícola é ainda maior em plantas com alto conteúdo de nitrogênio nas sementes, como é o caso da soja (Kinugasa *et al.* 2012). O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja (<https://www.embrapa.br/soja>; dados de 2014) e figura como o país com maior área potencial para expansão do seu cultivo (Dall'Agnol *et al.* 2010). A soja é a principal *commodity* agrícola do país, com o maior faturamento bruto e líder nas exportações do agronegócio, sendo que para a safra 2014/2015 é esperado que a cultura alcance o patamar de 31 milhões de hectares (Hirakuri 2014). Porém, os fertilizantes representam um ponto vital para a viabilidade econômica da sojicultura: juntamente com o custo de produtos fitossanitários, o custo agregado da fertilização representa o principal estrangulamento da produção de grãos no contexto atual (Hirakuri 2014).

Segundo dados da Embrapa, as culturas mais importantes no Brasil, tanto pela extensão da área que ocupam como pelo alto consumo de fertilizantes, são soja, cana-de-açúcar, milho, feijoeiro comum, feijão-caupi, arroz e trigo (www.embrapa.br; dados de 2014). Apesar de serem culturas que, em algum grau, podem ser beneficiadas por processos biológicos, como a fixação biológica de nitrogênio, juntas, essas culturas consomem mais de 1,9 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados por ano. A estimativa é de que em 2030 a área cultivada com estas culturas ultrapasse 70 milhões de hectares e o consumo de fertilizante nitrogenado seja superior a 2,5 milhões de toneladas (<https://www.embrapa.br>, dados de 2014). Fica claro que uma economia substancial para agricultores em termos de redução de uso de fertilizantes poderia ser alcançada aumentando-se a eficiência do metabolismo de nitrogênio em plantas de interesse agrícola.

O emprego de organismos diazotróficos na agricultura como modo de aumentar a eficiência da fixação de nitrogênio pelas culturas é bastante comum, principalmente nas culturas de soja. No entanto, a eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio depende de muitos fatores, como a compatibilidade entre bactérias e plantas hospedeiras, competição pela infecção das plantas e diferentes condições ambientais (Terpolilli *et al.* 2012). A alta salinidade do solo, por exemplo, característica de grande parte da superfície terrestre, pode ter efeitos negativos tanto na sobrevivência da bactéria e na atividade fotossintética e crescimento das plantas, quanto na infecção e colonização, estrutura e função do nódulo (Zahran 1999). Fungicidas, amplamente utilizados para o controle de doenças importantes das culturas, também podem afetar vários passos da simbiose, desde a taxa de crescimento e sobrevivência da bactéria até a formação dos nódulos e eficiência na fixação de nitrogênio (Campo *et al.* 2009). A aplicação de herbicidas nas lavouras também afeta a fixação biológica de nitrogênio, podendo reduzir o número de nódulos, a área foliar e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (Zobiolo *et al.* 2007). Mesmo em soja transgênica resistente ao herbicida glifosato, que em 2008 já representava aproximadamente 70% da plantação mundial de soja (James 2008), são observados fortes efeitos negativos desse composto na eficiência da simbiose (Zobiolo *et al.* 2010). Em regiões tropicais, como no Brasil, a acidez e a baixa fertilidade do solo, as altas temperaturas e o estresse hídrico também são limitantes da contribuição efetiva desta prática (Hungria e Vargas 2000). Considerando todos esses fatores, torna-se evidente a importância da busca por alternativas

para o aumento da eficiência do metabolismo de nitrogênio em plantas economicamente importantes.

1.5. Metabolismo da Ureia

Nas últimas décadas, diversos transportadores responsáveis pela absorção e distribuição de compostos nitrogenados em plantas foram identificados (Rentsch *et al.* 2007). É interessante mencionar que a primeira aquaporina identificada em plantas foi a nodulina-26 de soja, expressa especificamente em nódulos simbióticos e permeável à amônia (Fortin *et al.* 1987; Wallace *et al.* 2006). Também já foi identificada uma série de transportadores de outras formas de nitrogênio, como transportadores de ureídeos e aminoácidos (Tegeder 2014). Em relação à ureia, durante muito tempo acreditou-se que, por apresentar baixo peso molecular e caráter neutro, essa molécula entrasse na célula vegetal por simples difusão através das membranas (Galluci *et al.* 1971). A primeira evidência experimental confiável de que a absorção de ureia pela célula vegetal poderia ocorrer por intermédio de proteínas ocorreu somente em 1988 (Wilson *et al.* 1988), mas a identificação das proteínas em questão ocorreu mais de dez anos depois (Gerbeau *et al.* 1999; Liu, Ludewig, Frommer, *et al.* 2003). Portanto, os aspectos moleculares e fisiológicos do transporte de ureia pelas plantas estão recém emergindo.

Outra hipótese bastante difundida é a de que as plantas assimilam basicamente a amônia e o nitrato gerados pela conversão microbiana da ureia no solo. Assim, a absorção de ureia diretamente do solo pela planta e a hidrólise interna da ureia não eram considerados processos significativos. Essa visão está sendo agora desafiada pela constatação de que as plantas possuem transportadores de ureia, tanto ativos quanto passivos, hidrolisam-na de maneira bastante eficiente e são capazes de utilizar a ureia como a única fonte de nitrogênio (Witte 2011).

Até hoje, os únicos transportadores ligados ao transporte de ureia em plantas são os homólogos de DUR3 e as aquaporinas (Wang *et al.* 2008). DUR3 foi identificado por Liu *et al.* (2003) em *Arabidopsis*, através de um ensaio de complementação funcional em levedura. DUR3 possui 14 hélices transmembrana e foi caracterizado como um transportador ativo, que cotransporta ureia e prótons, mesmo contra um gradiente de concentração. Há evidências da participação desse transportador na captação de ureia do

ambiente e também no transporte interno de ureia, já que apresenta maior expressão sob deficiência de nitrogênio na membrana plasmática de células de raízes, tanto em pelos radiculares como perto do xilema, e durante a germinação de sementes (Liu, Ludewig, Frommer, *et al.* 2003; Kojima *et al.* 2007). Mutações do gene de DUR3 em linhagens de *Arabidopsis* confirmaram a relevância biológica desse processo na planta. A alta afinidade de DUR3 pelo substrato deve refletir uma adaptação das plantas aos baixos níveis de ureia normalmente encontrados em solos não fertilizados (Kojima *et al.* 2007).

A primeira demonstração do transporte de ureia por aquaporinas em plantas se deu em 1999, quando um homólogo de TIP de tabaco (*Nicotiana tabacum*) foi expresso em oócitos de *Xenopus*, mostrando-se permeável a água, glicerol e ureia (Gerbeau *et al.* 1999). Após, esse transporte foi relatado para algumas outras MIPs de plantas superiores, como *A. thaliana*, abobrinha (*Cucurbita pepo*), arroz (*O. sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), tulipa (*T. gesneriana*) e milho (*Zea mays*, Klebl *et al.* 2003; Liu, Ludewig, Gassert, *et al.* 2003; Gaspar *et al.* 2003; Holm *et al.* 2005; Soto *et al.* 2008; Mitani *et al.* 2008; Gu *et al.* 2012; Azad *et al.* 2012). Apesar disso, ainda não se sabe se a condução de ureia por aquaporinas em plantas possui relevância fisiológica ou se a ureia simplesmente não é excluída desses canais (Witte 2011). AtTIP4;1 de *Arabidopsis* foi identificada como transportadora de ureia em um ensaio de complementação em levedura (Liu, Ludewig, Gassert, *et al.* 2003) e é induzida em plântulas após cinco dias de privação de nitrogênio (Kim *et al.* 2008). Em mutantes com superexpressão do gene de AtTIP4;1, não são observadas alterações fenotípicas em resposta a uma série de estresses, como salinidade e seca. A resposta desses mutantes à presença de ureia não foi testada em plantas intactas, porém, folhas superexpressando AtTIP4;1 em contato com uma solução de ureia marcada com carbono-14 apresentaram maior absorção dessa substância em comparação com folhas controle (Kim *et al.* 2008). Um primeiro indício da relação entre a disponibilidade externa de ureia e os níveis de expressão de aquaporinas vegetais foi constatado em um estudo de transcriptoma em *Arabidopsis*, onde dois genes de aquaporinas tiveram a expressão aumentada por ureia em raízes (Mérigout, Lelandais, *et al.* 2008). Entretanto, um desses genes parece codificar uma pseudoaquaporina (primeiro motivo NPA ausente; Johanson *et al.* 2001) e a aquaporina codificada pelo outro gene (AtNIP2;1) não foi testada para o transporte de ureia. O gene AtTIP4;1 citado acima não apresentou expressão alterada nessas condições. Desde então, não foram publicadas mais pesquisas neste tópico.

Apesar de a ureia ser continuamente produzida em pequenas quantidades pela planta, principalmente através da ação da arginase (Polacco *et al.* 2013), e poder ser transportada de uma fonte externa, ela não se acumula nas células por causa da expressão praticamente constitutiva da enzima urease (Polacco e Winkler 1984; Sirko e Brodzik 2000). Ureases são enzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da ureia em dióxido de carbono e amônia (Dixon *et al.* 1975), que é então assimilada pela planta.

As ureases vegetais foram extensivamente estudadas em soja, que possui duas isoformas dessa enzima: a embrião-específica, encontrada na semente, e a ubíqua, expressa em todos os tecidos analisados (Polacco e Winkler 1984; Torisky e Polacco 1990; Torisky *et al.* 1994). Um terceiro gene de urease foi encontrado no genoma da soja, porém, devido ao grande número de mutações presentes, prediz-se que este seja inativo (Real-Guerra *et al.* 2013). É interessante salientar que, apesar de abundante, a urease embrião-específica de soja não parece ter função assimilatória essencial (Stebbins *et al.* 1991). Em vez disso, há evidências de envolvimento dessa proteína em mecanismos de defesa das plantas, por apresentar, por exemplo, propriedades inseticida e fungicida independentes da sua atividade ureolítica (Follmer *et al.* 2004; Becker-Ritt *et al.* 2007).

A atividade ureásica detectada em outros órgãos vegetais já teve confirmada a sua importância para a fisiologia da soja: mutantes urease-negativos (Stebbins *et al.* 1991) e plantas de soja cultivadas em privação de níquel (Eskew *et al.* 1983) ou tratadas com inibidores da atividade ureásica (Todd e Polacco 2004) acumulam ureia nos tecidos, o que causa necrose foliar. A importância dessas enzimas na assimilação da ureia também já foi demonstrada em outras plantas, como arroz e batata (Gerendás *et al.* 1998; Witte *et al.* 2002).

Apesar da associação cada vez mais clara entre ureases e o metabolismo de ureia em plantas, não foram ainda realizados estudos que relacionem alterações nos níveis de expressão dos transportadores de ureia e, portanto, alterações na absorção e transporte dessa molécula, com a expressão da enzima responsável pelo seu consumo. Além disso, outras questões referentes à eficiência do uso da ureia também permanecem sem resposta. Plantas cultivadas em ureia como a única fonte de nitrogênio apresentam crescimento reduzido e, em alguns casos, sinais de deficiência de nitrogênio quando comparadas a plantas cultivadas em nitrato de amônio (Gerendás e Sattelmacher 1997; Mérigout, Lelandais, *et al.* 2008; Cao *et al.* 2010). Apesar de os autores sugerirem algumas

explicações, como menor absorção dessa forma de nitrogênio, as razões moleculares para o uso ineficiente da ureia ainda não foram esclarecidas (Witte 2011). É preciso considerar que não somente a absorção, mas também o transporte interno e armazenamento das formas de nitrogênio são importantes para o metabolismo e para a eficácia do uso dos fertilizantes. A adição de inibidores de urease aos fertilizantes para desacelerar a clivagem de ureia no solo foi um primeiro passo bem sucedido para diminuir as perdas de nitrogênio (Gans *et al.* 2006; Soares *et al.* 2012). Porém, para que novas estratégias sejam elaboradas nesse sentido, mais pesquisas são necessárias para entender os efeitos da nutrição por ureia em plantas.

Uma etapa fundamental para o entendimento dos processos envolvidos na nutrição nitrogenada em soja é a identificação e caracterização das proteínas responsáveis pelo transporte das diferentes fontes de nitrogênio. Até o presente momento, transportadores de ureia de soja não haviam sido identificados. Estudos recentes revelaram a presença de um número grande de genes de aquaporinas no genoma dessa planta: foram identificados 66 genes por Zhang *et al.* (2013) e 72 genes por Deshmukh *et al.* (2013). SDPs para o transporte de ureia foram encontradas em 46 proteínas deduzidas (Zhang *et al.* 2013), porém, não foram realizados ensaios para a confirmação dessa capacidade. Um conhecimento mais profundo acerca dos transportadores de ureia em soja e sua regulação pela fonte externa de nitrogênio não somente proporcionará uma melhor compreensão da importância da ureia na nutrição nitrogenada da planta, mas também poderá permitir uma melhora na sua utilização como fertilizante nitrogenado na produção agrícola.

2. Justificativa e Objetivos

As aquaporinas estão envolvidas em uma série de processos fundamentais para o crescimento e desenvolvimento vegetal, como resposta a estresses e nutrição mineral. O nitrogênio é um dos nutrientes indispensáveis à planta e a ureia é o fertilizante nitrogenado mais utilizado no mundo, com aplicação substancial nas plantações de soja. Apesar da importância econômica mundial dessa planta, informações acerca do conjunto de aquaporinas presente nessa espécie são escassas e contraditórias. Portanto, caracterizar as aquaporinas presentes em soja proverá informações de suma importância para futuros estudos acerca dos mecanismos moleculares de equilíbrio hídrico, assimilação de nutrientes e resposta a estresses nessa cultura. Além disso, investigar a relevância fisiológica das aquaporinas e ureases de soja no transporte e metabolismo de ureia poderá permitir a exploração de novas estratégias para melhorar a eficiência do uso de nitrogênio na agricultura.

Os objetivos específicos dessa tese são:

- Identificar os genes de aquaporinas presentes do genoma da soja;
- Caracterizar estruturalmente as proteínas deduzidas;
- Caracterizar funcionalmente aquaporinas pertencentes a diferentes subgrupos em relação ao transporte de água e outros substratos;
- Avaliar os níveis de expressão de aquaporinas e ureases de soja em plantas crescidas na presença de diferentes fontes de nitrogênio.

3. Materiais e Métodos

3.1. Identificação dos Genes de Aquaporinas em Soja

Para a identificação das aquaporinas presentes em soja, foi inicialmente realizada uma busca através de BLASTP no genoma da soja, disponível na base de dados do Phytozome (<http://phytozome.net>; Goodstein *et al.* 2012). Para a busca, foram utilizadas sequências de aquaporinas conhecidas: aquaporin-1 de *Bos taurus* (ID: NP_777127.1); GlpF de *E. coli* (ID: WP_032330355.1) e as 35 sequências de aquaporinas de *A. thaliana*, obtidas no Phytozome (Johanson *et al.* 2001). As sequências encontradas foram analisadas no programa Geneious versão 6.1.6 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.* 2012) para verificação do tamanho e da presença dos domínios conservados. Todas as sequências selecionadas foram submetidas à predição de hélices transmembrana através do servidor TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>; Krogh *et al.* 2001).

3.2. Análise de Sequência das Aquaporinas de Soja

Com o objetivo de identificar os resíduos de aminoácidos que formam o filtro seletivo e os motivos NPA, foi realizado um alinhamento múltiplo através do ClustalW (Larkin *et al.* 2007) com todas as sequências identificadas em soja e outras 37 sequências de aquaporinas, cujos filtros seletivos já foram identificados previamente (Fu *et al.* 2000; Johanson *et al.* 2001; Sui *et al.* 2001; Törnroth-Horsefield *et al.* 2006).

Cada sequência identificada foi utilizada como *query* para uma busca por sequências similares no banco de dados do NCBI. Os primeiros 20 resultados de cada busca foram analisados para classificação das aquaporinas de soja nos diferentes subgrupos descritos para essa família.

3.3. Predição da Localização Subcelular

A predição da localização subcelular foi realizada *in silico* através dos servidores BaCelLo (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/bacello>; Pierleoni *et al.* 2006), LocTree3 (<https://roslab.org/services/loctree3>; Goldberg *et al.* 2014), MemLoc (http://mu2py.bioco

mp.unibo.it/memloci; Pierleoni *et al.* 2011) e Protein Prowler (http://bioinf.scmb.uq.edu.au:8080/pprowler_webapp_1-2; Hawkins e Bóden 2006).

3.4. Modelagem Molecular por Homologia e Análise Estrutural

Para a modelagem molecular comparativa, foram selecionados três possíveis moldes: AQP1 de *Bos taurus* (PDB ID 1J4N); GlpF de *E. coli* (PDB ID 1FX8) e SoPIP2;1 de *S. oleracea* na sua conformação aberta (PDB ID 2B5F), todos com estruturas tridimensionais determinadas por cristalografia (Fu *et al.* 2000; Sui *et al.* 2001; Törnroth-Horsefield *et al.* 2006).

As sequências molde e os alvos foram alinhados através do ClustalW e a modelagem molecular foi realizada com o uso do programa Modeller 9v10 (Martí-Renom *et al.* 2000; Eswar *et al.* 2006). Foram construídos dez modelos para cada alvo. A modelagem foi realizada em colaboração com o Dr. Rodrigo Ligabue Braun, no Laboratório de Bioinformática Estrutural liderado pelo Professor Dr. Hugo Verli.

A qualidade estereoquímica dos modelos foi avaliada através do programa Procheck (Laskowski *et al.* 1993). Os modelos também foram avaliados visualmente, descartando os que apresentavam padrões estruturais não condizentes com o padrão geral bem conservado das aquaporinas (como sítios NPA deslocados em relação à sua localização canônica).

As representações gráficas das proteínas foram geradas utilizando o programa PyMOL Molecular Graphics System versão 1.7.4 (Schrödinger LLC). Para calcular o raio ao longo do canal das aquaporinas, foi utilizado o programa MOLE 2.0 (Sehnal *et al.* 2013).

3.5. Plantas de Soja e Tratamentos

Sementes de soja (*Glycine max* cultivar Williams 82) foram esterilizadas com etanol 70% e com hipoclorito de sódio 1%, lavadas com água destilada e germinadas em papel filtro umedecido, no escuro a 28 °C. Após o surgimento da raiz primária, as sementes germinadas foram transferidas para sistema hidropônico e mantidas a 28 °C com fotoperíodo de 16 h e solução nutritiva estéril de Hoagland e Arnon (1950), com

modificações (400 μM de CaSO_4 , 200 μM de MgSO_4 , 43,5 μM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 μM de MnSO_4 , 0,03 μM de CuSO_4 , 0,08 μM de ZnSO_4 , 3 μM de NaCl , 0,01 μM de Na_2MoO_4 e 10 μM de FeCl_3). Nos tratamentos com ureia, esta foi adicionada na concentração de 2 mM em substituição ao sulfato de amônio após o sétimo dia de cultivo. As soluções nutritivas foram renovadas a cada 2 dias.

A análise do perfil de expressão das aquaporinas ao longo do desenvolvimento da planta foi realizada em semente quiescente, semente germinada (três dias em papel filtro umedecido), radícula, hipocótilo e cotilédones (três dias após a germinação) e raízes, caule e folhas (uma semana e um mês após a germinação) de plantas cultivadas em solução nutritiva com sulfato de amônio.

Para comparar a expressão dos genes de aquaporinas e ureases em soja cultivada com diferentes fontes de nitrogênio, foram utilizadas raízes (4 cm abaixo dos cotilédones) e parte aérea (caule e folhas, 4 cm acima dos cotilédones) de plântulas crescidas em solução nutritiva contendo sulfato de amônio ou ureia por um, três e sete dias. Todas as amostras foram coletadas no mesmo horário, das 13 h às 15 h, durante o ciclo claro, de maneira a evitar possíveis diferenças de expressão temporal circadiana.

3.6. Extração de RNA e Síntese de cDNA

O RNA total dos tecidos foi extraído imediatamente após a coleta com o kit *GeneJet Plant RNA Purification* (Thermo Scientific), seguindo as orientações do fabricante, e as amostras submetidas a tratamento com desoxirribonuclease I (Sigma-Aldrich). A síntese de cDNA a partir do RNA total isolado foi feita com o kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific), conforme especificações do fabricante, utilizando iniciadores oligo(dT).

3.7. Análise da Expressão Gênica

A expressão dos genes TIP1;9 e TIP2;5 foi analisada por PCR semiquantitativo, utilizando o termociclador Techne TC412 e iniciadores específicos (Tab. 1) desenhados com o servidor Primer3 (<http://primer3.ut.ee>; Untergasser *et al.* 2012). O gene da actina de soja (Glyma08g15480.1) foi utilizado como controle. As seguintes condições foram

utilizadas nas reações: 94 °C por 3 min (desnaturação inicial), 40 ciclos a 94 °C por 30 s (desnaturação), 60 °C por 30 s (anelamento) e 72 °C por 60 s (extensão) e extensão final a 72 °C por 5 min. Para a visualização dos resultados nos géis de agarose, foi utilizado o corante fluorescente de ácidos nucleicos GelRed (Biotium).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para técnica de PCR semiquantitativo.

Gene	Iniciador Senso	Iniciador Antisenso
GmTIP1;9	CAAATTCATCACCGGCGGAC	ACATAAACCCAGCAAGCCCA
GmTIP2;5	CAGTGTGCTGCGGGAATTG	GCAAACTATACTAGGGAAAGCCAT
Actina	GTTCTCTCCTTGTATGCAAGTG	CCAGACTCATCATATTCACCTTTAG

PCR quantitativo em tempo real foi utilizado com o objetivo de comparar os níveis de expressão das aquaporinas e ureases nos tratamentos feitos com ureia ou sulfato de amônio. Os genes foram selecionados com base na identidade de sequência com MIPs de outras plantas que já foram demonstradas como transportadoras de ureia. Os iniciadores específicos (Tab. 2) para dezesseis aquaporinas e para duas isoformas de urease de soja (urease ubíqua, *UreU*; urease embrião-específica, *UreEB*) foram desenhados com o uso do servidor Primer3 (Untergasser *et al.* 2012). Para normalizar a quantidade de RNA presente em cada amostra, os genes da metaloprotease dependente de zinco (MTP) e da proteína Fbox foram utilizados como controles internos (Wiebke-Strohm *et al.* 2012). A técnica foi realizada em termociclador modelo Eco (Illumina) com o kit qPCR-Sybr Green (Ludwig Biotec). As seguintes condições reacionais foram utilizadas: 95 °C por 5 min (desnaturação inicial) e 40 ciclos a 95 °C por 10 s (desnaturação), 60 °C por 15 s (anelamento) e 72 °C a 15 s (extensão). O fator de diluição utilizado para o cDNA foi de 1:20. As curvas de dissociação foram realizadas em temperaturas variando de 55 °C a 95 °C, com aumento gradual da temperatura (0,1 °C/s). Ensaios foram realizados em quadruplicatas técnicas de duas amostras biológicas. A análise dos dados foi feita por quantificação comparativa, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak e Schmittgen 2001). Foi realizada análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas usando o teste de Tukey com confiança de 0,05.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para técnica de PCR em tempo real.

Gene	Iniciador	Sequência
GmPIP1;1	Senso	CTGCTGGAATCTCAGGGGGTCATAT
	Antisenso	GCTCGAACCCCTTAACCTACACCAG

GmPIP1;6	Senso	TGCTGGAATTCAGGGGGACACAT
	Antisenso	CCCTCAAAGCCCTTCACCACAC

Tabela 2. Continuação.

Gene	Iniciador	Sequência
GmPIP2;6	Senso	AATCTCTGGGGGACACATCAACCC
	Antisenso	AACGATTTCTGGAACCCTTTGGCC
GmPIP2;14	Senso	CTGGGATTTTCAGGAGGTCACATTAAC
	Antisenso	ACTTTTGGAAGCCTTAACTAAACCAACTC
GmTIP1;4	Senso	GGGCATGTTAACCCTGCTGTCAC
	Antisenso	AGATGTTTCCAATCCACCAGTGGCAA
GmTIP1;6	Senso	ACTCGGCTCTGTCGTTGCTT
	Antisenso	CACTGCAGTTGCGTACACCG
GmTIP1;7	Senso	TCACTGCCTCCCCTGTTCCA
	Antisenso	CAATAATTCCCAAATTGCCCTTCTTGGGG
GmTIP1;8	Senso	ACCTTCGGCGCCTTCGTC
	Antisenso	ACCCTTCTTGGGGTCAATGGC
GmTIP1;9	Senso	CCGGCGGACAGGATGTACC
	Antisenso	CTCCCAAACCTACCCCTCCTGCT
GmTIP2;2	Senso	TCGCTTACAACGAGCTTACAAAAGATGCA
	Antisenso	ATCCAAAAGTAACAGCTGGGTTCAAATGG
GmTIP2;3	Senso	GGTTTTGCACTCTTTGTTGCAGTTTCTGTT
	Antisenso	AGAAGCCACACTGTGGATTGGAGTT
GmTIP2;4	Senso	GGTTTTGCACTCTTTGTTGCAGTTTCTGTC
	Antisenso	TGAAGCCACACTGTGGATTGGAGT
GmTIP2;5	Senso	AGCCTATGCTAAGTTGACATCAGATGCAG
	Antisenso	AACCCAAAGGTCACAGCAGGG
GmTIP2;7	Senso	TCAGCCATAGCCTATGCTAAGTTGACATCA
	Antisenso	GGTCACAGCAGGGTTCACATGG
GmTIP3;2	Senso	AGCCTTGCTTTGGTTAAGATTTACCAGGA
	Antisenso	AAATGTCACAGCTGGGTTGACATGG
GmTIP4;1	Senso	CCTCAACCCCGCCGTCA
	Antisenso	GAAGTGGAGTTGCCTGTCCTCCT
GmTIP4;2	Senso	CATCTTTCGTTCCCTGCTCTATTGGATTGA

	Antisenso	TACAAACCCAACCAGTGTGGGC
GmNIP2;1	Senso	ATCCCGCGGTTTCTCTTGC
	Antisenso	CAGCAGGTGATGTTCTCCAAT

Tabela 2. Continuação.

Gene	Iniciador	Sequência
UreU	Senso	CTGTGAAGAATGTGAGGAAGCTCACCA
	Antisenso	AGTCTTGGCTGCGGTGCAG
UreEB	Senso	ACCCAACACGCCCTTTAACACTCAATACTA
	Antisenso	ATCGTTCCTTCTCTTATCCTTGAACATGC
Fbox	Senso	AGATAGGGAAATGGTGCAGGT
	Antisenso	CTAATGGCAATTGCAGCTCTC
MTP	Senso	ATGAATGACGGTCCCATGTA
	Antisenso	GGCATTAAAGGCAGCTCACTCT

3.8. Leveduras e Meios de Cultura

A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* YLL043W (BY4742; MAT α ; *ura3* Δ 0; *leu2* Δ 0; *his3* Δ 1; *lys2* Δ 0; YLL043w::kanMX4), com deleção do gene da aquagliceroporina FPS1, foi obtida da EUROSCARF (*European Saccharomyces cerevisiae Archive for Functional Analysis* – Johann Wolfgang Goethe University, Alemanha) e a linhagem YNVW1 (Δ ura3), com deleção do transportador de ureia DUR3, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Ao longo do texto essas linhagens serão referenciadas como Δ FPS1 e Δ DUR3. Ambas possuem o genótipo Δ ura3, de maneira que são incapazes de crescer em meio deficiente de uracila. Esse fenótipo foi complementado pelo plasmídeo pYES2 (Invitrogen), que contém o gene *ura3* como marca de seleção e é induzível por galactose.

Meio rico YPD (extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2% e glicose 2%) foi utilizado para manutenção e crescimento das leveduras não-transformadas. Para manutenção e crescimento das leveduras transformadas foi utilizado meio YNB sem uracila (YNB 0,68%, Sigma-Aldrich *Yeast Synthetic Drop-out Media Supplement* 0,08% e

glicose 2%), substituindo a glicose por rafinose 2% e galactose 1% para expressão dos genes de interesse. Para os meios sólidos foi adicionado ágar a 2%.

3.9. Clonagem dos Genes de Aquaporinas em Leveduras

Iniciadores foram desenhados nas extremidades 5' e 3' de cada gene, com adição de sítios de restrição para clonagem e correta inserção no vetor de expressão (Tab. 3). Os genes foram amplificados por PCR pela enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). As seguintes condições foram utilizadas nas reações: 94 °C por 2 min (desnaturação inicial), 35 ciclos a 94 °C por 30 s (desnaturação), 55 °C por 30 s (anelamento) e 68 °C por 60 s (extensão) e extensão final a 68 °C por 5 min.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificação de cDNAs completos.

Gene	Iniciador	Sequência
GmTIP1;9	Senso	GGCGGCTCGAGAAAAAATGTCTGCGTACCGCAGCGCCATC
	Antisenso	CGCCTCTAGATTAATAATAACTTCTGCGAAACCTCTGACGGCTA
GmTIP2;5	Senso	GGCGGGCGGCCGCAAAAAAATGGCTGGCATAGCATTC
	Antisenso	CGCGCCTCGAGTCAAATTCAGTAGCGAGAGG
GmTIP3;2	Senso	TAACCAGCGGCCGCAACACAATGTCTGCAACCCGTAGATATTCTTTTGG
	Antisenso	TCGCCCTCGAGCTAGTAATCTTCAGGAGCCAAAGGTT
GmNIP2;1	Senso	TAACCAGCGGCCGCAACACAATGTCTGAGGGGACCAGCAGCC
	Antisenso	TCGCCCTCGAGTCACACCAAGCATCTTTGGTC

Os cDNAs completos das aquaporinas de soja amplificados por PCR foram clonados no vetor p-GEM-T Easy (Promega) e transformados em células competentes de *E. coli* DH5 α por choque térmico. As células foram plaqueadas em meio Luria Bertani (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, ágar 1,5%) com ampicilina 100 μ g/mL e, após crescimento *overnight* das colônias transformadas, o vetor foi purificado utilizando um kit de purificação de DNA plasmidial (Ludwig Biotec) e os genes completos das aquaporinas foram clivados do vetor p-GEM-T Easy com as enzimas de restrição apropriadas (XhoI e XbaI ou NotI e XhoI) e inseridos no mesmo sítio do plasmídeo de expressão pYES2 (Invitrogen). O sequenciamento dos genes foi realizado através de

serviço prestado pela ACTGene Análises Moleculares (Ludwig Biotec). Para transformação das células de *S. cerevisiae* foi empregado, seguindo as instruções do fabricante, o *Yeast Transformation Kit* (Sigma). Os transformantes foram selecionados em meio de cultura na ausência de uracila.

3.10. Complementação Funcional em Levedura

O ensaio de estresse osmótico foi realizado com células de *S. cerevisiae* Δ FPS1 expressando as aquaporinas de interesse ou contendo o pYES vazio (controle). As células foram crescidas em meio líquido YNB por 18 h à 30 °C, diluídas para obtenção de absorbância (600 nm) de 0,5 e foram feitas diluições seriadas (1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000) e plaqueamento em meio sintético mínimo sem uracila complementado com 1 M de NaCl. Da mesma maneira, essa linhagem foi utilizada para verificar o transporte de peróxido de hidrogênio e ácido bórico pelas aquaporinas de soja, utilizando o mesmo meio de cultura complementado com 2,5 mM ou 3,0 mM de H₂O₂ ou 20 mM de H₃BO₃. As diferenças nos fenótipos foram registradas após cinco dias de incubação.

3.11. Espectroscopia de fluorescência (*stopped-flow*)

A permeabilidade à água e ureia das aquaporinas de soja expressas em *S. cerevisiae* foi analisada por espectroscopia de fluorescência pela técnica de interrupção brusca do fluxo (*stopped-flow*), realizada no Laboratório de Transporte Biológico, na Universidade de Lisboa. Leveduras Δ FPS1 ou Δ DUR3 foram cultivadas em meio sintético mínimo sem uracila com galactose para indução da expressão dos genes de aquaporinas. Células transformadas com o pYES vazio foram utilizadas como controle. As células foram lavadas três vezes em solução com 1,4 M de sorbitol, pH 5,0, e ressuspensas na mesma solução (3 mL/g). Após, foram incubadas em gelo por 90 min e então a 30 °C por mais 20 min com 100 μ M do precursor não-fluorescente diacetato de 5-(6-)carboxifluoresceína (CFDA). Essa molécula é intracelularmente hidrolisada liberando sua forma fluorescente (excitação/emissão: 492/517 nm), que não é capaz de permear a membrana e possui a propriedade de autoextinção da fluorescência (*self-quenching*). Quando submetidas a um choque osmótico, as células respondem alterando seu volume através da entrada ou saída

de água. Da mesma forma, quando sujeitas a um gradiente de concentração com um soluto permeante, como glicerol ou ureia, a entrada ou saída desse soluto é acompanhada por movimentos de água, também provocando alterações do volume intracelular e, conseqüentemente, variações na concentração do fluoróforo. Assim, uma diminuição do volume induz a um aumento da concentração do fluoróforo, resultando em uma diminuição da fluorescência que obedece a uma relação linear. Desse modo, os sinais de fluorescência obtidos pelo aparato de *stopped-flow* podem ser convertidos em sinais de variação relativa de volume celular.

Para caracterizar o transporte de água e ureia das linhagens de *S. cerevisiae* transformadas com as diferentes construções, as células equilibradas em uma solução com 1,4 M de sorbitol foram confrontadas com igual volume de diferentes soluções hiperosmóticas em um equipamento de *stopped-flow* (HI-TECH Scientific PQ/SF-53) com temperatura controlada e interface computacional (IBM PC/AT 80386). Para a análise da permeabilidade à água, foram utilizadas as leveduras Δ FPS1 e 2,1 M de sorbitol como solução hiperosmótica. Como a membrana celular é impermeável ao sorbitol, o gradiente osmótico criado provoca um movimento de saída de água da célula, resultando em uma diminuição do volume celular e aumento da concentração do fluoróforo, o que implica na diminuição da fluorescência. A cada sinal é feito o ajuste (*fitting*) de uma exponencial simples, a partir do que a constante de velocidade do processo (k) pode ser obtida (equação 1). O coeficiente de permeabilidade (P_f), expresso em cm/s, pode ser estimado pela relação linear com k (equação 2), de acordo com Soveral *et al.* (2007).

$$I = -\Delta I^{(-kt)} + I_{\infty} \quad \text{Equação 1}$$

$$P_f = k(V_o/A)(1/V_w(\text{osm}_{\text{out}})_{\infty}) \quad \text{Equação 2}$$

Nas equações, ΔI representa a amplitude do sinal (unidades arbitrárias), t é o tempo (s), I_{∞} é o valor em que se atinge o estado estacionário (unidades arbitrárias); V_o é o volume inicial das células (cm^3), A é a área das células (cm^2), V_w é o volume molar da água (cm^3/mol) e $(\text{osm}_{\text{out}})_{\infty}$ é a osmolaridade média final após o choque osmótico (mol/cm^3).

Para analisar a permeabilidade das aquaporinas à ureia, as células de levedura Δ DUR3 transformadas foram confrontadas com igual volume de uma solução com 0,7 M de sorbitol e 1,4 M de ureia. A permeabilidade relativa à ureia foi calculada utilizando o declive (m) de cada sinal obtido, referente à entrada de ureia nas células. O m calculado para as células controle foi considerado o valor 1 de permeabilidade relativa.

Os ensaios foram realizados nas temperaturas de 10, 18, 23, 28 e 33 °C. A energia de ativação (E_a) para o transporte de água ou de ureia (equação 3), representada em kcal/mol, foi avaliada a partir do declive obtido na representação gráfica de Arrhenius ($\ln(P_f)$ ou $\ln(m)$ em função do inverso da temperatura $1/T$).

$$E_a = SR/1000$$

Equação 3

S representa o coeficiente angular da reta (declive obtido na representação gráfica de Arrhenius) e R é a constante universal dos gases (kcal/mol).

3.12. Tratamento Estatístico

Né!

4. Resultados e Discussão

Parte I

Identificação e Caracterização Estrutural das Aquaporinas de Soja

4.1.1. Identificação das Aquaporinas no Genoma da Soja

Estudos de identificação das famílias de aquaporinas de plantas têm sido baseados em métodos *in silico*. A soja possui seu genoma sequenciado (Schmutz *et al.* 2010), de maneira que foi possível realizar uma busca por sequências de aquaporinas nessa planta através de BLAST utilizando MIPs de outros organismos como referência. As sequências resultantes dessa pesquisa foram analisadas para verificação do tamanho das proteínas deduzidas e da presença dos domínios conservados no programa Geneious (Kearse *et al.* 2012). Proteínas truncadas ou que não apresentavam os dois motivos NPA foram excluídas. As sequências restantes foram analisadas no servidor TMHMM para predição de domínios transmembrana. Em um estudo comparativo dos programas disponíveis para predição da topologia de proteínas transmembrana, o servidor TMHMM foi considerado o programa de melhor desempenho (Möller *et al.* 2001). Foram excluídas as sequências que não formaram de cinco a sete hélices na análise pelo servidor. Através da análise dos modelos estruturais construídos (seção 4.1.3), foi possível confirmar a presença das seis hélices transmembrana nessas MIPs, mesmo nas poucas aquaporinas que apresentaram cinco ou sete hélices nos resultados do TMHMM. Assim, foram identificados 66 genes completos da família das MIPs em soja. As sequências proteicas deduzidas variam entre 216 e 313 aminoácidos. Informações a respeito das aquaporinas identificadas, como códigos identificadores do Phytozome, tamanho das cadeias polipeptídicas e resíduos de aminoácidos conservados, estão sumarizadas na tabela 4.

Através da comparação entre as sequências de aminoácidos dessas aquaporinas com MIPs vegetais previamente identificadas em outros organismos, foi possível classificar as aquaporinas de soja nas cinco subfamílias comumente observadas em plantas superiores. As 66 aquaporinas encontradas dividem-se em 21 PIPs, 23 TIPs, 12 NIPs, 8 SIPs e 2 XIPs. O número de isoformas, apesar de ser maior que o encontrado em *Arabidopsis* e arroz, com 35 e 33 isoformas respectivamente (Johanson *et al.* 2001; Sakurai *et al.* 2005), é comparável ao número encontrado em outras plantas, como a couve chinesa, que apresenta 53 genes não-redundantes de aquaporinas (*Brassica rapa*; Tao *et al.* 2014), o algodoeiro, que possui 71 isoformas (*Gossypium hirsutum*; Park *et al.* 2010), e *Populus trichocarpa*, com 55 isoformas (Gupta e Sankararamkrishnan 2009).

Tabela 4. Identificação e classificação dos genes de aquaporinas de soja, tamanho das sequências polipeptídicas deduzidas, discriminação dos resíduos de aminoácidos que fazem parte dos filtros seletivos e motivos NPA e nomenclatura proposta por Zhang *et al.* (2013).

Identificação Phytozome	Subgrupo	Tamanho da sequência de aminoácidos	Filtro Seletivo				NPA		Nomenclatura Zhang <i>et al.</i> , 2013	Observações
			H2	H5	LE1	LE2	LB	LE		
Glyma03g14150.1	PIP1	285	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP1;1	
Glyma01g42950.1	PIP1	287	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP1;3	
Glyma11g02530.1	PIP1	287	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP1;4	
Glyma05g37730.1	PIP1	288	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP1;5	
Glyma08g01860.1	PIP1	290	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP1;6	
Glyma14g06680.1	PIP1	290	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP1;7	
Glyma11g35030.1	PIP1	290	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP1;8	
Glyma04g00450.1	PIP2	276	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;1	
Glyma06g00550.1	PIP2	279	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;2	
Glyma11g20600.1	PIP2	287	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;3	
Glyma12g08040.1	PIP2	287	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;4	
Glyma12g29510.1	PIP2	288	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;5	
Glyma13g40100.1	PIP2	288	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;6	
Glyma03g33800.1	PIP2	287	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;7	
Glyma19g36530.1	PIP2	286	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;8	
Glyma02g08110.1	PIP2	286	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;9	
Glyma16g27130.1	PIP2	286	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;10	
Glyma16g27140.1	PIP2	286	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;11	
Glyma02g08120.1	PIP2	286	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;12	
Glyma10g35520.1	PIP2	297	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;13	
Glyma20g32000.1	PIP2	285	F	H	T	R	NPA	NPA	GmPIP2;14	
Glyma02g10520.1	TIP1	253	H	I	A	V	NPA	NPA	GmTIP1;1	
Glyma18g52360.1	TIP1	253	H	I	A	V	NPA	NPA	GmTIP1;2	

Tabela 4. Continuação.

Identificação Phytozome	Subgrupo	Tamanho da sequência de aminoácidos	Filtro Seletivo				NPA		Nomenclatura Zhang <i>et al.</i> , 2013	Observações
			H2	H5	LE1	LE2	LB	LE		
Glyma10g43680.1	TIP1	253	H	I	A	V	NPA	NPA	GmTIP1;3	
Glyma11g15200.1	TIP1	253	H	I	A	V	NPA	NPA	GmTIP1;4	
Glyma12g07120.1	TIP1	246	H	I	A	V	NPA	NPA	GmTIP1;5	
Glyma13g40820.1	TIP1	253	H	I	A	V	NPA	NPA	GmTIP1;6	
Glyma03g34310.1	TIP1	251	H	I	A	V	NPA	NPA	GmTIP1;7	
Glyma19g37000.1	TIP1	251	H	I	A	V	NPA	NPA	GmTIP1;8	
Glyma13g20940.1	TIP1	251	H	V	A	A	NPA	NPA	GmTIP1;9	
Glyma01g41670.1	TIP2	250	H	I	G	R	NPA	NPA	GmTIP2;1	
Glyma11g03690.1	TIP2	250	H	I	G	R	NPA	NPA	GmTIP2;2	
Glyma07g02060.1	TIP2	249	H	I	G	R	NPA	NPA	GmTIP2;3	
Glyma08g21730.1	TIP2	249	H	I	G	R	NPA	NPA	GmTIP2;4	
Glyma13g43250.1	TIP2	248	H	I	G	R	NPA	NPA	GmTIP2;5	
Glyma15g02090.1	TIP2	248	H	I	G	R	NPA	NPA	GmTIP2;6	
Glyma19g04450.1	TIP2	238	H	I	G	R	NPA	NPA	GmTIP2;7	
Glyma09g28930.1	TIP3	256	H	I	A	L	NPA	NPA	GmTIP3;1	
Glyma16g33530.1	TIP3	256	H	I	A	L	NPA	NPA	GmTIP3;2	
Glyma10g31750.1	TIP3	255	H	I	A	R	NPA	NPA	GmTIP3;3	
Glyma20g35860.1	TIP3	255	H	I	A	R	NPA	NPA	GmTIP3;4	
Glyma04g08830.1	TIP4	247	H	I	A	R	NPA	NPA	GmTIP4;1	
Glyma06g08910.1	TIP4	247	H	I	A	R	NPA	NPA	GmTIP4;2	
Glyma09g35860.1	TIP5	248	S	V	G	C	NPA	NPA	GmTIP5;1	
Glyma05g29510.1	NIP1	271	W	V	A	R	NPA	NPA	GmNIP1;1	
Glyma08g12660.1	NIP1	275	W	V	A	R	NPA	NPA	GmNIP1;2	
Glyma13g29690.1	NIP1	274	W	V	A	R	NPA	NPA	GmNIP1;3	

Tabela 4. Continuação.

Identificação Phytosome	Subgrupo	Tamanho da sequência de aminoácidos	Filtro Seletivo				NPA		Nomenclatura Zhang <i>et al.</i> , 2013	Observações
			H2	H5	LE1	LE2	LB	LE		
Glyma15g09370.1	NIP1	268	W	V	A	R	NPA	NPA	GmNIP1;4	
Glyma08g12650.1	NIP1	272	W	V	A	R	NPA	NPA	GmNIP1;5	Nodulina-26
Glyma09g37280.1	NIP2	294	G	S	G	R	NPA	NPA	GmNIP2;1	
Glyma18g49410.1	NIP2	296	G	S	G	R	NPA	NPA	GmNIP2;2	
Glyma07g34150.1	NIP4	269	W	V	A	R	NPA	NPA	GmNIP4;1	
Glyma02g41400.1	NIP4	216	W	V	A	R	NPA	NPA	PseudoNIP#1	Sugerimos o nome NIP4;2
Glyma10g36560.1	NIP5	291	A	I	G	R	NPS	NPV	GmNIP5;1	
Glyma08g23230.1	NIP6	307	N	I	S	R	NPA	NPV	GmNIP6;1	
Glyma15g00620.1	NIP6	305	T	I	G	R	NPA	NPV	GmNIP6;2	
Glyma02g07680.1	SIP1	248	I	I	P	F	NPT	NPA	GmSIP1;1	Resíduo em H5 (Zhang <i>et al.</i> , 2013): T
Glyma16g26720.1	SIP1	246	I	I	P	F	NPT	NPA	GmSIP1;2	Resíduo em H5 (Zhang <i>et al.</i> , 2013): T
Glyma19g28430.1	SIP1	249	V	V	P	N	NPT	NPA	GmSIP1;3	Resíduo em H5 (Zhang <i>et al.</i> , 2013): M
Glyma16g04800.1	SIP1	249	V	V	P	N	NPT	NPA	GmSIP1;4	Resíduo em H5 (Zhang <i>et al.</i> , 2013): M
Glyma12g10430.1	SIP1	240	N	A	P	N	NPS	NPA	GmSIP1;5	Resíduo em H5 (Zhang <i>et al.</i> , 2013): I
Glyma06g46340.1	SIP1	240	N	A	P	N	NPS	NPA	GmSIP1;6	Resíduo em H5 (Zhang <i>et al.</i> , 2013): I
Glyma03g27340.1	SIP2	231	S	H	G	S	NPL	NPA	PseudoSIP#2	Sugerimos o nome SIP2;1
Glyma19g30320.1	SIP2	237	S	H	G	S	NPL	NPA	PseudoSIP#3	Sugerimos o nome SIP2;2
Glyma11g10360.1	XIP	271	V	V	V	R	SPV	NPA	GmXIP1;1	Resíduo em H5 (Zhang <i>et al.</i> , 2013): I
Glyma12g02640.1	XIP	313	V	V	A	R	NPI	SPA	GmXIP1;2	Resíduo em H5 (Zhang <i>et al.</i> , 2013): I

O grande número de MIPs vegetais fica evidente especialmente se comparado às treze isoformas presentes em mamíferos. Essa característica deve resultar da necessidade aumentada de absorção, fluxo e evaporação de água pelas plantas, além da necessidade de absorção e transporte de outras moléculas, como nutrientes que são substratos para essas proteínas (Gomes *et al.* 2009). Segundo Forrest e Bhave (2007), a diversidade e complexidade dessa família de proteínas em plantas pode ser explicada, em parte, pela própria natureza séssil desses organismos, inexistência de um sistema circulatório e presença de um número maior de compartimentos celulares em comparação aos animais. Especificamente em soja, uma explicação possível para o grande número de genes de aquaporinas encontrados é o fato de essa espécie apresentar mais de um evento de duplicação do genoma ao longo de sua história evolutiva, tendo o evento mais recente ocorrido há apenas treze milhões de anos (Schmutz *et al.* 2010; Roulin *et al.* 2013).

Em 2013 foi publicado um artigo científico com a identificação e caracterização dos genes de aquaporinas em soja (Zhang *et al.* 2013). Esses genes foram nomeados de acordo com a regra vigente para nomenclatura de aquaporinas, baseada em homologia de sequência e análise filogenética e, portanto, essa designação será mantida no presente trabalho (Tab. 4). Zhang *et al.* também identificaram, através de uma abordagem similar a nossa, genes de 66 MIPs no genoma da soja. Porém, três desses genes – Glyma18g42630 (PIP), Glyma02g15870 (NIP) e Glyma10g03870 (NIP) – não foram caracterizados na nossa análise uma vez que a sequência proteica deduzida não inicia com o aminoácido metionina. Contudo, três outras sequências que avaliamos como genes de aquaporinas potencialmente funcionais foram consideradas como pseudoaquaporinas pelos autores do estudo em questão. As justificativas para essa classificação não ficam claras no artigo. Além disso, os autores identificaram 19 pseudoaquaporinas que tampouco foram caracterizadas no presente estudo por se tratarem de sequências truncadas, sem a presença dos domínios conservados ou com regiões transmembrana incompletas.

Em outro trabalho, publicado no mesmo ano, também foi realizada a identificação da família de aquaporinas em soja (Deshmukh *et al.* 2013). A principal diferença em relação aos nossos resultados foi a identificação de mais três sequências de NIPs, Glyma14g35030, Glyma05g29500 e Glyma14g07560, não caracterizados na presente análise por apresentarem sequências truncadas. Zhang *et al.* (2013) também classificaram esses genes como pseudoaquaporinas. Dentro de cada subfamília, as aquaporinas ainda

podem ser classificadas em diferentes subgrupos. Foram encontradas também algumas discrepâncias entre as pesquisas com relação a essa classificação, as quais serão especificadas ao longo do texto.

No presente estudo, a subfamília das PIPs foi classificada nos dois subgrupos já conhecidos: foram encontradas sete aquaporinas pertencentes ao subgrupo PIP1 e quatorze ao PIP2. Todos os representantes apresentam os motivos NPA canônicos e o filtro seletivo extremamente conservado, composto por Phe em H2, His em H5, Thr em LE1 e Arg em LE2. Apesar do alto nível de conservação, as funções das PIPs variam na planta. Elas podem apresentar respostas distintas na mediação do transporte de água, com mecanismos regulatórios modulados de acordo com o tipo de estresse aplicado, a duração do estresse e o órgão avaliado (Qian *et al.* 2015). Além disso, embora a maioria das PIPs tenha sido inicialmente caracterizada pelo transporte exclusivo de água, já existem evidências do transporte de outras substâncias por alguns membros, como peróxido de hidrogênio e dióxido de carbono (Uehlein *et al.* 2012; Bienert *et al.* 2014; Heinen *et al.* 2014). Além desses substratos, Zhang *et al.* (2013) ainda constataram regiões conservadas que indicam o possível transporte de ácido bórico e ureia. Um estudo recente, realizado através da expressão constitutiva da aquaporina GmPIP1;6 em plantas de soja, indicou seu envolvimento na regulação do crescimento vegetativo e na tolerância à alta salinidade (Zhou *et al.* 2014).

As TIPs formam uma subfamília mais diversa, caracterizada pelo transporte de um espectro mais amplo de substratos, que pode ser dividida em 5 subgrupos (Johanson *et al.* 2001). No presente trabalho, a análise do genoma da soja revelou a presença de nove TIPs1, sete TIPs2, quatro TIPs3, duas TIPs4 e uma TIP5. Todas as TIPs, assim como as PIPs, apresentam os dois motivos NPA canônicos conservados nas alças LB e LE, mas verificam-se variações nos resíduos de aminoácidos formadores do filtro seletivo (Tab. 4). Apesar dessas variações, que devem elevar o número de moléculas transportadas por essa subfamília, e da quantidade relativamente alta de membros, a análise das SDPs realizada por (Zhang *et al.* 2013) indica apenas o transporte de peróxido de hidrogênio e ureia por essas proteínas.

Inicialmente, imaginava-se que as NIPs só eram expressas na membrana peribacterióide dos nódulos fixadores de nitrogênio de plantas leguminosas. Porém, NIPs já foram isoladas de diversas plantas não-leguminosas em diferentes localizações

subcelulares (Liu *et al.* 2009). Nodulina-26, a aquaporina de soja mais bem caracterizada e que dá nome à subfamília, pertence ao subgrupo NIP1, juntamente com outras quatro aquaporinas. Ainda foram identificadas, no presente estudo, duas aquaporinas pertencentes ao subgrupo NIP2, duas ao NIP4, uma ao NIP5 e duas assinaladas ao subgrupo NIP6. Subgrupos como NIP3 e NIP7, encontrados em outras espécies vegetais, não foram identificados em soja. A ausência de determinados subgrupos é comum e varia conforme o organismo analisado. Além da Nodulina-26, permeável à água, glicerol e amônio (Dean *et al.* 1999; Hwang *et al.* 2010), duas outras NIPs de soja já foram caracterizadas: GmNIP2;1 e GmNIP2;2. Ambas transportaram silício em um ensaio com oócitos de *Xenopus* e têm sua expressão aumentada em soja de acordo com a concentração de silicato de potássio na solução nutritiva (Deshmukh *et al.* 2013).

A subfamília das NIPs foi a que apresentou maior número de contradições entre os resultados do presente estudo e dos trabalhos publicados. Uma entre as duas NIPs4 identificadas, codificada pelo gene Glyma02g41400, foi categorizada por Zhang *et al.* (2013) como pseudoNIP. Essa proteína, entretanto, apresenta as seis hélices transmembrana esperadas e dois motivos NPA, entre outras características estruturais bem conservadas em aquaporinas, e também foi considerada potencialmente funcional na análise realizada por Deshmukh *et al.* (2013). Portanto, sugerimos que ela seja designada NIP4;2. Porém, Deshmukh *et al.* (2013) classificam as sequências de GmNIP4;1 e GmNIP4;2 como NIPs1 e GmNIP5;1, GmNIP6;1 e GmNIP6;2 como NIPs3. Essa classificação difere da realizada por Zhang *et al.* (2013), cujos nossos resultados corroboram.

As NIPs encontradas em soja exibem variabilidade tanto no filtro seletivo quanto na sequência do segundo motivo NPA (Tab. 4). Tais variações podem permitir que os membros dessa subfamília sejam permeáveis a múltiplos substratos. Em conformidade com essa observação, as análises *in silico* realizadas por Zhang *et al.* (2013) revelam que as NIPs de soja são potencialmente permeáveis a água, amônia, ácido bórico, peróxido de hidrogênio, silício e ureia.

A subfamília das SIPs normalmente possui menos isoformas que as PIPs, TIPs e NIPs. Neste trabalho, foram identificadas seis SIPs1 e duas SIPs2, com filtros seletivos bastante heterogêneos (Tab. 4). Enquanto as SIPs1 apresentam Ile\Val\Asn em H2, Ile\Val\Ala em H5, Pro em LE1 e Phe\Asn em LE2, nas SIPs2 as posições do filtro são

ocupadas por Ser em H2, His em H5, Gly em LE1 e Ser em LE2. Esses dados são distintos dos apresentados por Zhang *et al.* (2013). Os autores sugerem que a segunda posição do filtro seletivo (H5) seja ocupada por Thr em vez de Ile nas SIP1;1 e SIP1;2, Met em vez de Val nas SIP1;3 e SIP1;4 e Ile no lugar de Ala nas SIP1;5 e SIP1;6. Além disso, as duas SIPs2 identificadas aqui e designadas SIP2;1 e SIP2;2 são consideradas como pseudoaquaporinas por esses autores. Zhang *et al.* (2013) justificam essa definição afirmando tratarem-se de sequências truncadas. Porém, nossas análises confirmam a presença, nessas sequências, de todos os elementos que caracterizam uma aquaporina. A identificação e caracterização das sequências das oito SIPs de soja por Deshmukh *et al.* (2013) são congruentes com nossos resultados.

As XIPs foram descobertas mais recentemente e informações a respeito da estrutura e função desse subgrupo ainda são bastante escassas. Elas foram encontradas primeiramente no musgo *Physcomitrella patens* (Danielson e Johanson 2008) e não estão presentes em *Arabidopsis* (Johanson *et al.* 2001) nem em couve chinesa (Tao *et al.* 2014). Duas XIPs foram encontradas no genoma da soja e as quatro posições do filtro seletivo são ocupadas por Val em H2, Val em H5, Val\Ala em LE1 e Arg em LE2 (Tab. 4). Esses mesmos resíduos de aminoácidos também foram identificados na análise de Deshmukh *et al.* (2013), enquanto Zhang *et al.* (2013) sugerem que Ile ocupe a posição em H5, no lugar da Val. Considerando que isoleucina e valina possuem cadeias laterais hidrofóbicas e de tamanho semelhante, essa mudança provavelmente não implicaria em mudanças na seletividade. Contudo, avaliações realizadas com base nas sequências de aminoácidos não permitiram prever a quais moléculas essas aquaporinas são permeáveis (Zhang *et al.* 2013).

Não foi possível determinar, através das nossas análises, a qual subgrupo as XIPs pertencem. Zhang *et al.* (2013), por meio de análise filogenética, classificaram ambas como XIP1, enquanto Deshmukh *et al.* (2013) categorizaram como XIP1 e XIP2. Um alinhamento entre as duas sequências utilizando o ClustalW mostrou identidade superior a 69%, que é o valor normalmente encontrado entre XIPs de um mesmo subgrupo (Gupta e Sankararamkrishnan 2009). À vista disso, mantivemos a classificação e a nomenclatura publicada por Zhang *et al.* (2013).

A tabela 5 apresenta uma comparação entre os motivos NPA encontrados em aquaporinas de soja com os motivos encontrados em outras plantas, evidenciando a alta

conservação dessa região entre PIPs e TIPs. Somente em SIPs e XIPs e, com menos frequência, em algumas NIPs, foi encontrada variação nos casos analisados. Por representar uma região importante para a seletividade, a modulação dos motivos NPA pode levar a alterações na permeabilidade do canal, além de influenciar na oligomerização (Ikeda *et al.* 2011).

Tabela 5. Comparação entre os motivos NPA encontrados nas MIPs de soja, *Arabidopsis* (Johanson *et al.* 2001), algodoeiro (Park *et al.* 2010), *P. trichocarpa* (Gupta e Sankararamkrishnan 2009) e couve chinesa (Tao *et al.* 2014).

Subgrupo	Soja		Arabidopsis		Algodoeiro		Populus		Couve chinesa	
	LB	LE	LB	LE	LB	LE	LB	LE	LB	LE
PIP1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
PIP2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TIP1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TIP2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TIP3	*	*	*	*			*	*	*	*
TIP4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TIP5	*	*	*	*			*	*	*	*
NIP1	*	*	*	NPG	*	*	*	*	*	NPG
NIP2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
NIP3			*	*			NPS	NPV	*	*
NIP4	*	*	*	*					*	*
NIP5	NPS	NPV	NPS	NPV	NPS	NPV			NPS	NPV
NIP6	*	NPV	*	NPV	*\NPT	NPV*			*	NPV
NIP7			NPS	*					NPS	*
SIP1	NPT\NPS	*	NPT\NPC	*	DPA\NPT*	*	NPT	*	NPT\NPC	*
SIP2	NPL	*	NPL	*			NPL	*	NPL\NPV	*
XIP1	SPV\NPI	*			NPI	*	NPI\NPL	*		
XIP2							SPV	*		

* indica que não há variação de sequência (NPA canônico);

Quadros vazios sinalizam os subgrupos ausentes em cada espécie.

4.1.2. Escolha do Molde para Modelagem Comparativa

A estrutura tridimensional das proteínas é muito importante para compreensão dos mecanismos moleculares que permitem a elas o desempenho de suas funções. Corroborando essa concepção, a estrutura tridimensional é normalmente mais conservada entre proteínas homólogas do que a sequência de aminoácidos (Chothia e Lesk 1986). A única aquaporina vegetal que teve sua estrutura tridimensional analisada através de cristalografia de raios X foi a PIP de espinafre SoPIP2;1 (Törnroth-Horsefield *et al.* 2006). Porém, a resolução dessa estrutura cristalográfica é relativamente baixa: 3.9 Å. Wallace e

Roberts (2004) classificaram as aquaporinas de *Arabidopsis* baseando-se na análise do filtro seletivo de modelos tridimensionais dessas proteínas, construídos através da técnica de modelagem por homologia. Como moldes, os autores utilizaram a GlpF de *E. coli* e a AQP1 bovina, cujas estruturas cristalográficas possuem uma resolução de 2,2 Å (Fu *et al.* 2000; Sui *et al.* 2001). As coordenadas atômicas dessas três estruturas foram testadas como moldes para a construção de modelos tridimensionais das aquaporinas de soja.

Para que a modelagem seja precisa, é recomendado que haja pelo menos 30% de identidade entre a sequência-alvo e o molde (Eswar *et al.* 2006). A GlpF apresentou, em média, grau de identidade em torno de 23% com as sequências de aquaporinas de soja, sendo que nenhuma das 66 sequências atingiu 30%. A AQP1 bovina apresentou em média 30% de identidade com as sequências de aquaporinas de soja e esse valor não ultrapassou 40%. Considerando a SoPIP2;1, o grau de identidade médio apresentado foi de 43% e ficou acima de 60% para quase 1/3 dos membros (apêndice 1). O fato de algumas aquaporinas não apresentarem o grau de identidade de sequência adequado com o molde não é um fator extremamente crítico nesse caso, devido à notória conservação estrutural entre todas as MIPs caracterizadas. A validade dessa abordagem foi comprovada através da modelagem por homologia da GlpF utilizando as coordenadas estruturais da AQP1 como molde, e da modelagem da AQP1 utilizando a estrutura da GlpF como molde. As sequências da GlpF e AQP1 apresentam 24% de identidade. Apesar disso, os esqueletos carbônicos dos modelos mostraram sobreposição razoável com as estruturas experimentais, com diferenças maiores nas alças e alta sobreposição nas regiões em contato com o poro (Wallace e Roberts 2004).

A utilização dos diferentes moldes não acarretou mudanças na qualidade dos modelos, segundo indicativos como o mapa de Ramachandran (Ramachandran *et al.* 1963). A figura 5 traz um exemplo de modelagem de uma TIP de soja realizada com cada um dos três moldes. Os modelos apresentam estruturas tridimensionais extremamente semelhantes e claramente sobreponíveis. As regiões mais variáveis são as alças, o que era já esperado considerando que a modelagem de regiões de alças estão entre as etapas mais problemáticas dessa técnica (Santos Filho e Alencastro 2003). Porém, quando a AQP1 foi utilizada como molde, o aminoácido localizado na posição H2 do filtro seletivo apareceu voltado para fora do canal em alguns modelos (Fig. 5, detalhe). Com base na inspeção visual dos modelos e nos graus de identidade de sequência apresentados, SoPIP2;1 foi

selecionada como molde para realização da modelagem comparativa de todas as aquaporinas identificadas em soja.

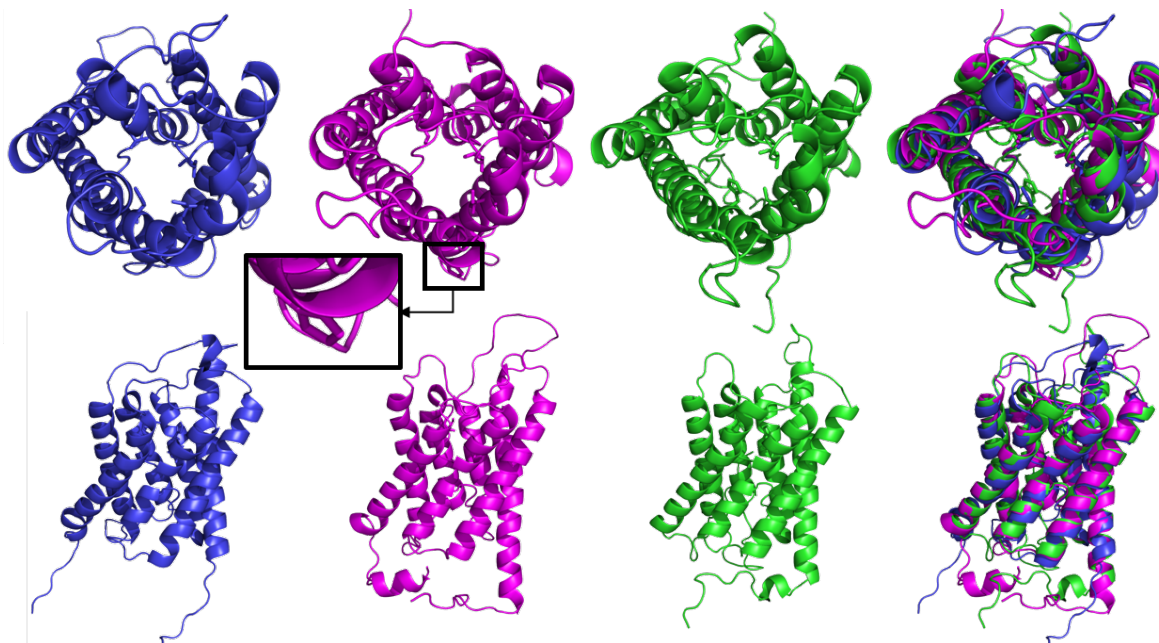


Figura 5. Teste de moldes realizado para modelagem da aquaporina GmTIP1;4. Os modelos estruturais gerados para GmTIP1;4 a partir dos moldes GlpF (azul), AQP1 (rosa) e SoPIP2;1 (verde) são mostrados em duas perspectivas. À direita, a sobreposição dos três modelos. O detalhe mostra o resíduo de histidina que ocupa a posição H2 do filtro seletivo voltado para fora do poro. As imagens foram geradas com o programa PyMOL Molecular Graphics System.

4.1.3. Análise Estrutural das Aquaporinas de Soja

A análise dos modelos confirmou que as estruturas tridimensionais das aquaporinas de soja são altamente conservadas entre as diferentes subfamílias. Todas as proteínas identificadas apresentam seis hélices transmembrana conectadas por cinco alças, com as extremidades N- e C-terminais voltadas para o mesmo lado (Fig. 6). Desse modo, a modelagem confirma que GmTIP4;2, GmSIP2;1 e GmSIP2;2, consideradas como pseudoaquaporinas por Zhang *et al.* (2013), não possuem sequências truncadas e fazem parte do conjunto de MIPs de soja. Os modelos apresentam a região dos motivos NPA em contato com o lúmen do poro e as cadeias laterais dos aminoácidos do filtro seletivo voltados para dentro do canal, evidenciando uma modelagem bem-sucedida.

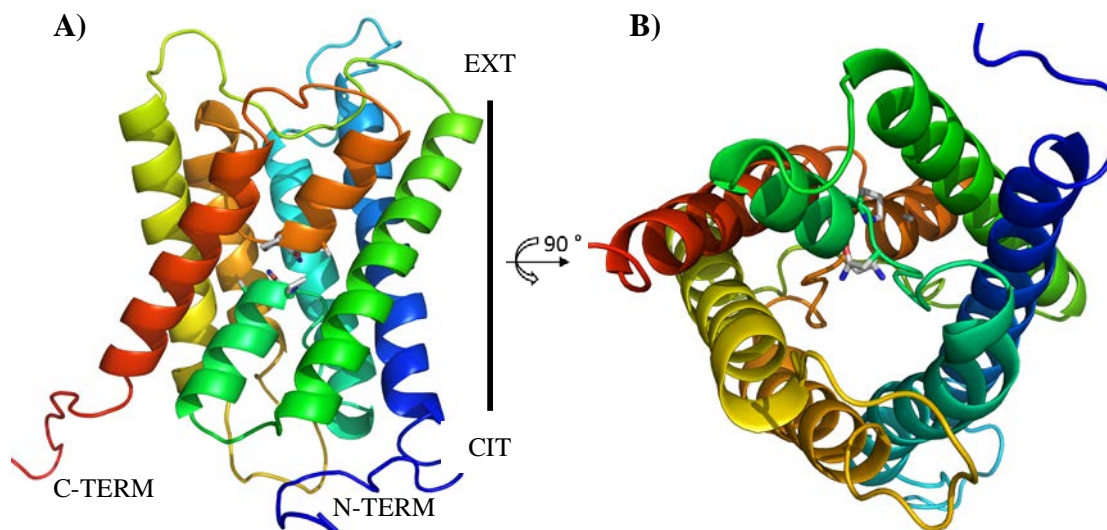


Figura 6. Modelo tridimensional representativo das aquaporinas de soja. As cadeias laterais dos aminoácidos dos motivos NPA estão representadas. **A)** Vista paralela à membrana. EXT, extracelular; CIT, citoplasmático; N-TERM, N-terminal; C-TERM; C-terminal. **B)** Vista perpendicular à membrana, desde o vestíbulo citoplasmático. As imagens foram geradas com o programa PyMOL Molecular Graphics System.

Apesar da conformação geral ser muito conservada, a região do filtro seletivo é bastante variável. A figura 7 traz uma comparação entre os 18 tipos distintos de filtro seletivo encontrados nas aquaporinas de soja. Os resíduos de aminoácidos formadores de cada filtro serão referidos ao longo do texto sempre na mesma ordem: H2-H5-LE1-LE2. Nos modelos gerados para as aquaporinas SIP1;1-1;6 e para as XIPs, os resíduos de aminoácidos identificados por Zhang *et al.* (2013), ocupando a posição H5 dos filtros seletivos, ficam voltados completamente para fora do canal. Já os resíduos identificados no presente trabalho encontram-se voltados para dentro do poro nos modelos tridimensionais. Dessa maneira, a avaliação dos modelos confirma a identidade do aminoácido presente em H5, corroborando a análise das sequências realizada no presente trabalho e por Deshmukh *et al.* (2013).

No caso da GmXIP1;1, única MIP em soja que possui três resíduos de valina e um de arginina formando o filtro seletivo, a região do segundo resíduo do filtro (H5) perde sua estrutura secundária, apresentando-se como uma região de alça (Fig. 7). Além dessa XIP, o grau variável de identidade entre as sequências modeladas e o molde pode ter influenciado as estruturas de GmSIP1;2, GmSIP1;4; GmSIP1;5 e GmSIP1;6, em que parte de um dos motivos NPA também perde sua estrutura de alfa-hélice. Isso provavelmente reflete um problema estrutural nos modelos, indicando que um ajuste manual do alinhamento-base

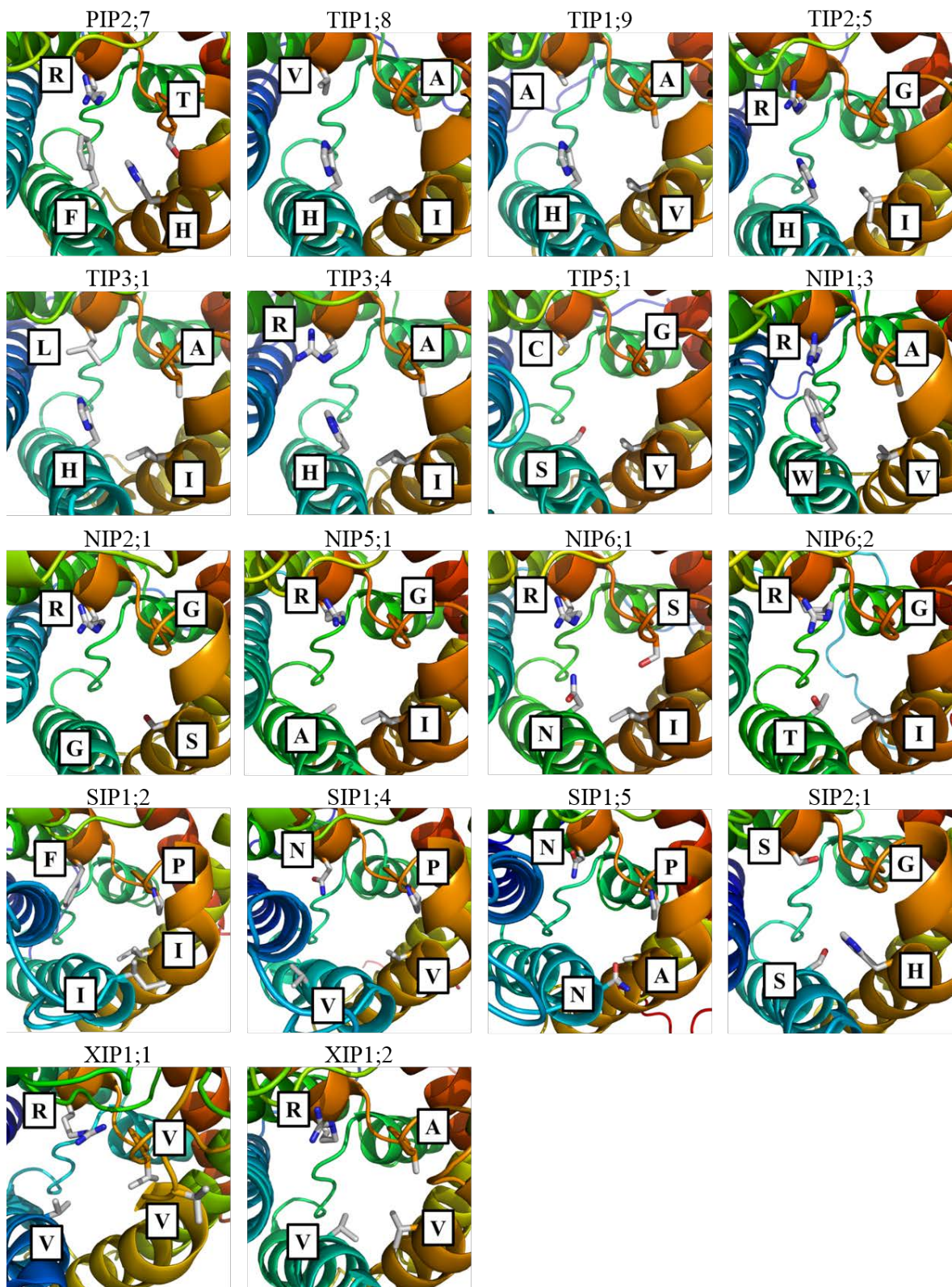


Figura 7. Filtros seletivos das aquaporinas de soja. As caixas brancas indicam o aminoácido presente em cada posição. As posições são apresentadas conforme à figura 2C: H5 à esquerda, embaixo; H2, LE1 e LE2 seguindo o sentido anti-horário. As imagens foram geradas com o PyMOL Molecular Graphics System.

para a modelagem seja necessário para a extensão das hélices nesses casos. Para evitar a inserção de algum viés nas estruturas, não houve manipulação seletiva de modelos específicos. Todas as estruturas foram submetidas ao mesmo protocolo de modelagem, avaliação e análise.

Entre os filtros seletivos encontrados em soja, os mais frequentemente relatados em vegetais superiores correspondem ao bem conservado filtro das PIPs (Phe-His-Thr-Arg), de algumas TIPs (His-Ile-Ala-Val, His-Ile-Gly-Arg, His-Ile-Ala-Arg) e de uma NIP (Trp-Val-Ala-Arg). Todos esses filtros seletivos são encontrados em pelo menos seis espécies de plantas vasculares (Johanson *et al.* 2001; Gupta e Sankararamakrishnan 2009; Reuscher *et al.* 2013; Park *et al.* 2010; Venkatesh *et al.* 2013; Tao *et al.* 2014). Em contrapartida, oito filtros seletivos, apresentados por onze aquaporinas em soja, não foram encontrados na literatura hoje disponível em outras plantas superiores: His-Val-Ala-Ala, His-Ile-Ala-Leu, Ser-Val-Gly-Cys, Asn-Ile-Ser-Arg, Ile-Ile-Pro-Phe, Asn-Ala-Phe-Asn, Val-Val-Val-Arg e Val-Val-Ala-Arg.

Para alguns substratos, como ureia, não somente a sequência de aminoácidos, mas também o tamanho do poro exercem uma importante influência na permeabilidade por aquaporinas (Beitz *et al.* 2006). Para analisar a arquitetura interna dos poros, foi calculado o raio ao longo do canal das aquaporinas, baseando-se nos modelos estruturais construídos e utilizando o programa Mole 2.0 (Sehna *et al.* 2013). De maneira a validar a aplicação da metodologia, foi realizada a análise dos perfis dos poros das estruturas cristalográficas da AQP1 (Sui *et al.* 2001) e da GlpF (Fu *et al.* 2000). Foram gerados gráficos com os valores de raio ao longo dos dois canais (Fig. 8) e os dados foram comparados à literatura. Para ambas as aquaporinas testadas, os valores encontrados foram muito semelhantes aos valores publicados na literatura, calculados através de outras ferramentas de análise e caracterização de canais (de Groot e Grubmüller 2001; Wang *et al.* 2005; Beitz *et al.* 2006; Newby *et al.* 2008). As semelhanças são ainda maiores na região do filtro seletivo: a maior discrepância encontrada nessa região entre os artigos analisados e o presente estudo foi de aproximadamente 0,3 Å.

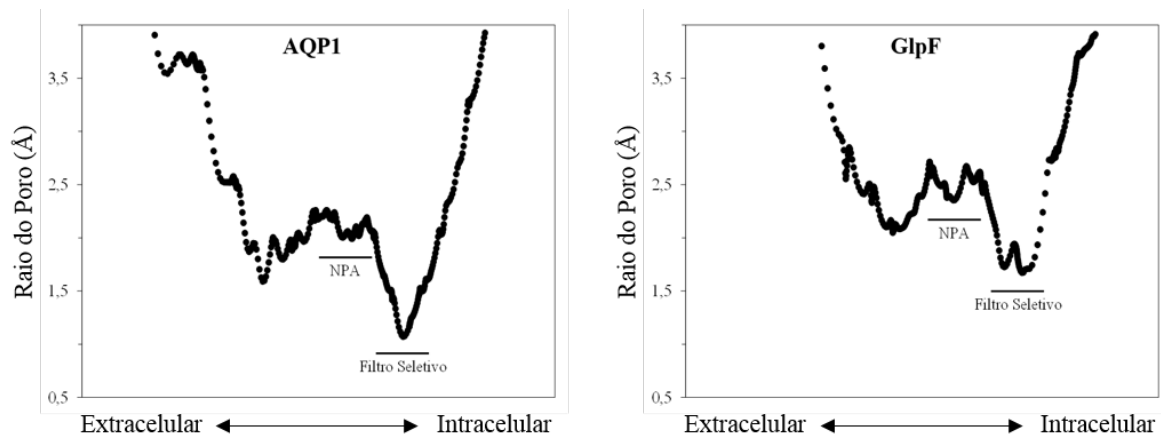


Figura 8. Raio ao longo do canal da AQP1 bovina e da GlpF de *E. coli*, calculado com o programa Mole 2.0. A região aproximada do filtro seletivo e dos motivos NPA está indicada nos gráficos.

A figura 9 apresenta os gráficos de raio ao longo do canal de 18 aquaporinas de soja, cada uma com um filtro seletivo distinto. Apesar da variação na arquitetura dos poros, as regiões do filtro seletivo e dos motivos NPA são normalmente as regiões mais estreitas do canal. As aquaporinas de soja apresentam um diâmetro que varia de 1,6 a 4,0 Å aproximadamente, sendo que os dois poros mais alargados correspondem a NIPs. Segundo a análise de Zhang *et al.* (2013), a subfamília das NIPs foi a que apresentou maior número de permeantes através da análise das SDPs.

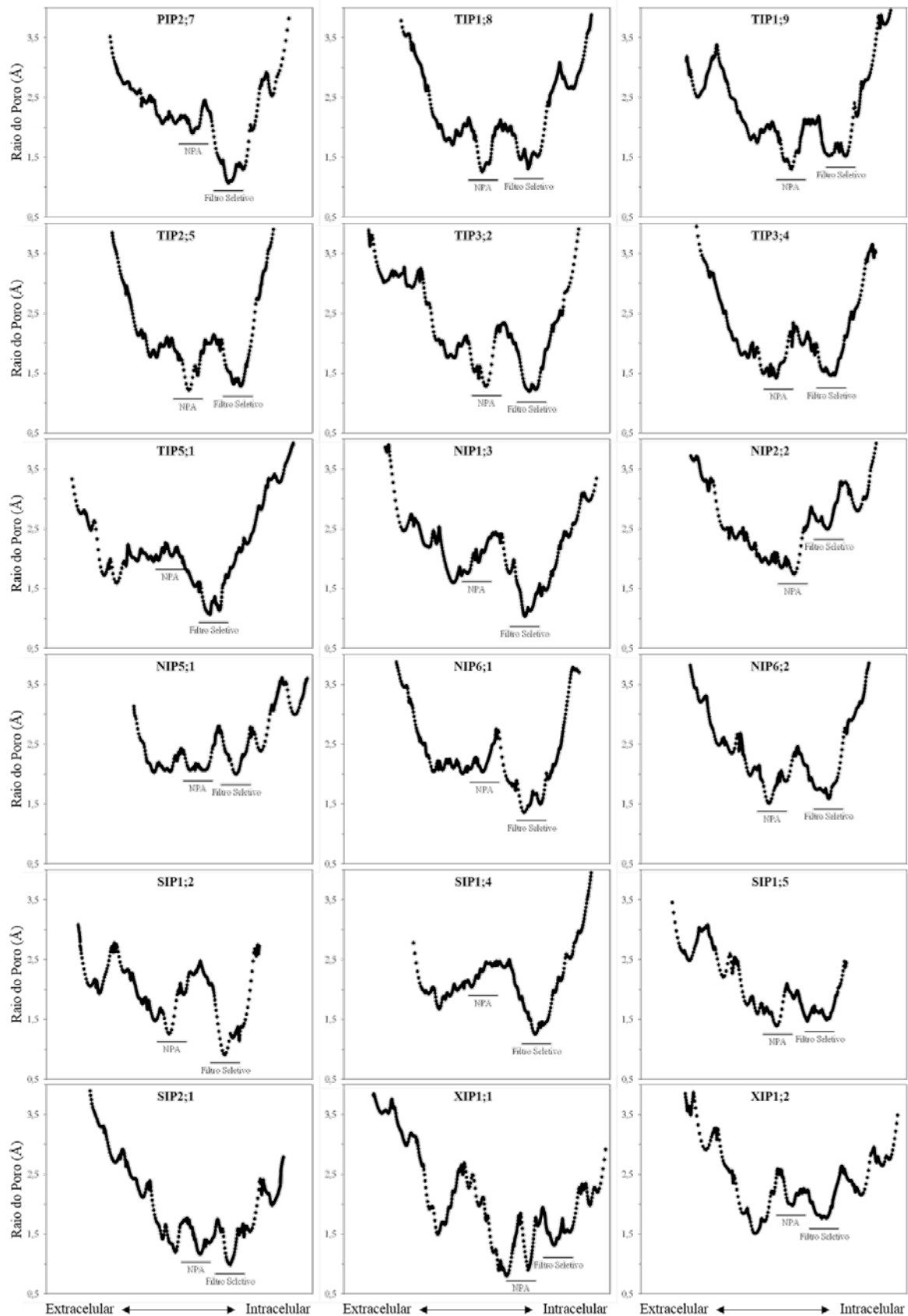


Figura 9. Raio ao longo do canal das aquaporinas de soja, calculado com o Mole 2.0. A região aproximada do filtro seletivo e dos motivos NPA está indicada em cada gráfico.

É importante salientar que esses resultados representam uma imagem estática dos canais. As aquaporinas, quando inseridas nas membranas celulares, podem apresentar modificações nos perfis. Um dos motivos para essa alteração são as mudanças que podem ocorrer na posição das cadeias laterais de aminoácidos que contornam o poro. Além disso, análises quantitativas devem ser avaliadas com cuidado, já que são apenas aproximações por serem baseadas em modelos estruturais de qualidades variadas (Sehna *et al.* 2013). No entanto, ensaios realizados com simulações de dinâmica molecular para AQP1 humana sugerem que a geometria do poro calculada a partir das simulações é muito similar à geometria calculada a partir da estrutura cristalográfica, indicando que esse canal seja relativamente rígido (Aponte-Santamaría *et al.* 2010).

Parte II

Caracterização Funcional de Quatro Aquaporinas de Soja

4.2.1. Predição da Permeabilidade e Localização Subcelular

A identificação da família de aquaporinas em soja e sua caracterização, através da análise das sequências de aminoácidos e das estruturas tridimensionais, foram os primeiros passos para melhor compreensão de suas potenciais funções. Entretanto, para começar a elucidar o papel individual de cada aquaporina no transporte de nutrientes e fisiologia da planta, são necessários análises funcionais e estudos de expressão. A interpretação dessas funções na planta é bastante desafiadora, já que as aquaporinas respondem a uma série de fatores, variando sua expressão de acordo com o tecido vegetal, o cultivar e o tipo e grau de estresse. Para contornar essas questões, a expressão heteróloga tem sido extensivamente utilizada para caracterização dos membros dessa família, mostrando-se uma abordagem bastante simples (Kaldenhoff *et al.* 2007).

Quatro genes de aquaporinas pertencentes a subgrupos distintos – GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 e GmNIP2;2 – foram amplificados e clonados em levedura. Essas MIPs possuem dois motivos NPA canônicos, formados por Asn-Pro-Ala, porém diferem quanto à composição do filtro seletivo. Dentro do subgrupo TIP1, GmTIP1;9 é o único membro que possui a sequência His-Val-Ala-Ala em vez de His-Ile-Ala-Val. Não foi possível encontrar, na literatura, esse filtro em aquaporinas de outras espécies, assim como His-Ile-Ala-Leu presente em GmTIP3;2. Além de semelhanças no diâmetro do canal, que apresenta um mínimo de aproximadamente 2,5 Å (Fig. 9), os filtros seletivos das duas TIPs também possuem um perfil parecido, onde prevalecem aminoácidos de cadeias laterais hidrofóbicas (Fig. 10). Em GlpF de *E. coli*, que possui um poro ligeiramente mais alargado, dois resíduos de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas na região do filtro permitem a interação com o esqueleto hidrocarbônico do glicerol, enquanto um aminoácido hidrofílico forma ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila dessa molécula, permitindo sua rápida permeação (Wallace e Roberts 2004). Além de glicerol, GlpF é também capaz de transportar ureia e tem baixa permeabilidade à água (Borgnia e Agre 2001). Considerando o diâmetro dos poros e as semelhanças com GlpF na região do filtro seletivo, é possível que GmTIP1;9 e GmTIP3;2 também apresentem seletividade para pequenos solutos, como ureia.

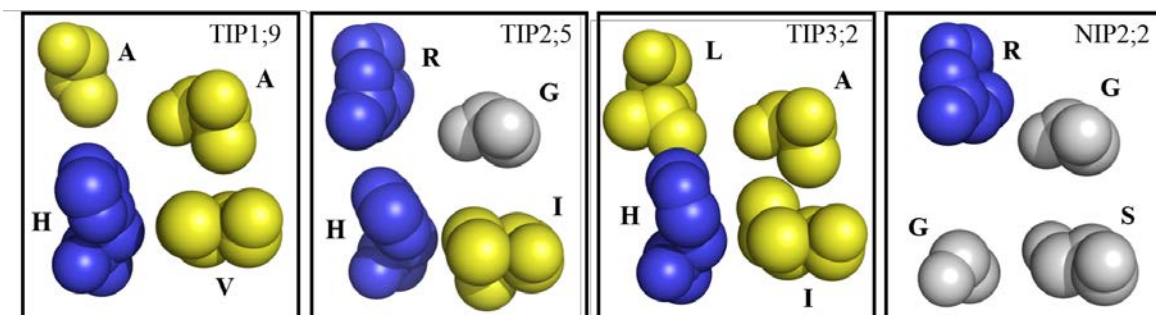


Figura 10. Comparação do filtro seletivo das quatro aquaporinas de soja clonadas em levedura. Os modelos em cada projeção estão posicionados perpendicularmente à bicamada lipídica e são vistos a partir do vestíbulo extracelular. O restante da estrutura de cada aquaporina foi ocultada para a melhor visualização dos aminoácidos do filtro seletivo. As cadeias laterais estão coloridas de azul para básico hidrofílico, amarelo para hidrofóbico e branco para hidrofílico neutro. A letra representativa de cada aminoácido aparece ao lado dos resíduos. Imagens geradas com o uso do PyMOL Molecular Graphics System.

A aquaporina de tulipa TgTIP1;1, apresentando a tétrede His-Ile-Ale-Ile ou com mutações para His-Ile-Ala-Val, é permeável a água, amônio, peróxido de hidrogênio e ureia, o que representa outra evidência sugestiva da capacidade de transporte desses pequenos solutos por GmTIP1;9 e GmTIP3;2 em soja, considerando as semelhanças entre os filtros seletivos e sua importância para a permeabilidade. Interessantemente, quando esses resíduos são mutados para His-Ile-Gly-Arg, tornando-se idênticos aos de GmTIP2;5, essa aquaporina de tulipa perde a capacidade de transporte de ureia e peróxido de hidrogênio. Esse filtro possui um perfil mais hidrofílico (Fig. 10) e é bastante comum, revelado em *Arabidopsis*, tomate, *Populus*, algodoeiro, batata e couve chinesa (Johanson *et al.* 2001; Gupta e Sankararamkrishnan 2009; Reuscher *et al.* 2013; Park *et al.* 2010; Venkatesh *et al.* 2013; Tao *et al.* 2014). A aquaporina AtTIP2;1 de *Arabidopsis* possui essa mesma composição de aminoácidos nessa região e foi caracterizada por transportar água, amônia e ureia (Liu, Ludewig, Gassert, *et al.* 2003; Klebl *et al.* 2003; Loque *et al.* 2005), assim como TaTIP2;1 de trigo (Holm *et al.* 2005). VvTip2;2 de videira, também com os mesmos resíduos, é permeável à água, peróxido de hidrogênio e ácido bórico (Sabir *et al.* 2014). Dessa maneira, é possível inferir que GmTIP2,5 é possivelmente permeada por uma série de substratos, porém, não somente essa tétrede de aminoácidos, mas também outros resíduos próximos que não necessariamente possuem contato com o lúmen do poro, devem ser importantes para definir a seletividade, possivelmente por influenciar a posição dos primeiros.

Entre as quatro aquaporinas funcionalmente caracterizadas neste trabalho, GmNIP2;2 é a única que já foi submetida a um ensaio de transporte previamente. O experimento foi realizado em oócitos de *Xenopus*, onde foi comprovado o transporte de silício por essa MIP (Deshmukh *et al.* 2013). Não foi testada a permeabilidade a nenhuma outra molécula. O filtro seletivo identificado em GmNIP2;2 (Gly-Ser-Gly-Arg) apresenta somente resíduos hidrofílicos na sua composição (Fig. 10) e já foi encontrado em NIPs de *Populus*, tomate e algodoeiro (Gupta e Sankararamakrishnan 2009; Reuscher *et al.* 2013; Park *et al.* 2010). Além dessa particularidade, essa aquaporina exibe um dos canais mais alargados nessa região dentre todas as MIPs de soja (Fig. 9), com 5,0 Å de diâmetro, decorrente da presença dos dois resíduos de glicina e da serina, que estão entre os menores aminoácidos encontrados. A região mais estreita do poro dessa MIP fica próxima aos motivos NPA, com aproximadamente 3,5 Å. Um estudo com CpNIP1 de abobrinha, relevou o transporte de ureia por essa aquaporina (Klebl *et al.* 2003). Através de uma análise da sequência de aminoácidos publicada por esses autores, identificamos os aminoácidos Gly-Ser-Gly-Arg como formadores do filtro seletivo de CpNIP1, os mesmos presentes em GmNIP2;2. Esse filtro seletivo também foi observado em NIPs de arroz e algodoeiro permeáveis à água, ureia, ácido bórico e ácido silícico (Katsuhara *et al.* 2014).

A inspeção pelas posições determinantes de especificidade (SDPs) sugerem que GmTIP1;9 e GmTIP2;5 podem transportar peróxido de hidrogênio, enquanto GmTIP3;2 e GmNIP2;2 possivelmente transportem ureia (Zhang *et al.* 2013). SDPs para amônia, ácido bórico, dióxido de carbono e ácido silícico não foram encontradas em nenhuma dessas aquaporinas.

A localização subcelular dessas proteínas ainda não é conhecida. A tabela 6 compara a predição da localização subcelular das aquaporinas de soja realizada com o uso de diversos servidores. Considerando as divergências existentes entre os resultados, não é possível prever, de maneira definitiva, em quais membranas essas MIPs estão inseridas. Os resultados mais homogêneos referem-se a GmNIP2;2, indicando sua localização na membrana plasmática e/ou na membrana do cloroplasto. Cabe ressaltar que, para algumas aquaporinas, a formação de heterotetrâmeros pode modular sua localização na célula (Zelazny *et al.* 2007).

Tabela 6. Predição da localização subcelular das aquaporinas de soja realizada através de diferentes servidores.

	Este trabalho	Zhang <i>et al.</i> (2013)	Deshmukh <i>et al.</i> (2013)
GmTIP1;9	Cloroplasto ¹	Retículo Endoplasmático ⁵	Citoplasma ⁵
	Vacúolo ²		Membrana Plasmática ⁶
	Vacúolo ³		
	Rota Secretória ⁴		
GmTIP2;5	Núcleo ¹	Membrana Plasmática ⁵	Vacúolo ⁵
	Vacúolo ²		Membrana Plasmática ⁶
	Vacúolo ³		
	Rota Secretória ⁴		
GmTIP3;2	Cloroplasto ¹	Mitocôndria ⁵	Citoplasma ⁵
	Vacúolo ²		Membrana Plasmática ⁶
	Vacúolo ³		
	Rota Secretória ⁴		
GmNIP2;2	Cloroplasto ¹	Extracelular ⁵	Membrana Plasmática ⁵
	Membrana Plasmática ²		Membrana Plasmática ⁶
	Membrana Plasmática ³		Cloroplasto ⁷
	Cloroplasto ⁴		

Servidores utilizados para a predição da localização subcelular: 1, BaCelLo; 2, LocTree3; 3, MemLoci; 4, Protein Prowler; 5, WoLF PSORT; 6, CELLO; 7, TargetP.

Independentemente da localização na célula vegetal, é possível o estudo de aquaporinas recombinantes em *S. cerevisiae*, já que pelo menos parte da proteína expressa é destinada à membrana plasmática da levedura (Klebl *et al.* 2003; Wudick *et al.* 2009). Não foi definido até hoje um limiar para o nível de expressão de aquaporinas na membrana dessas células que permita a observação de sua atividade. Para as NtAQP1 e NtPIP2;1 de tabaco, foi constatado que somente 4,1% e 2,1% do total de proteína expressa foi destinada à membrana da célula, respectivamente, mas essa quantidade foi suficiente para facilitar o transporte de dióxido de carbono pela NtAQP1 e água pela NtPIP2;1 (Otto *et al.* 2010). A expressão heteróloga de aquaporinas em levedura para ensaios de caracterização funcional já foi validada por diversos autores (Klebl *et al.* 2003; Pettersson *et al.* 2006; Otto *et al.* 2010; Noronha *et al.* 2014; Katsuhara *et al.* 2014; Heinen *et al.* 2014).

4.2.2. Ensaio de Estresse Osmótico

Para saber se esses genes identificados em soja codificam aquaporinas funcionais, foi realizado um ensaio de complementação funcional em uma linhagem de *S. cerevisiae* com deleção do gene da aquagliceroporina FPS1, que está envolvida na osmorregulação da levedura. Quando células são expostas a um choque hiperosmótico, encolhem devido à perda de água. Para compensar esse efeito, a levedura acumula glicerol através das rotas de síntese de glicerol e do fechamento do canal FPS1 (Hohmann 2002). Células com deleção do gene da aquagliceroporina FPS1 são capazes de crescer normalmente em meio hiperosmótico. A expressão heteróloga das quatro aquaporinas testadas afetou o crescimento sob esse estresse, confirmando a funcionalidade dos canais (Fig. 11).

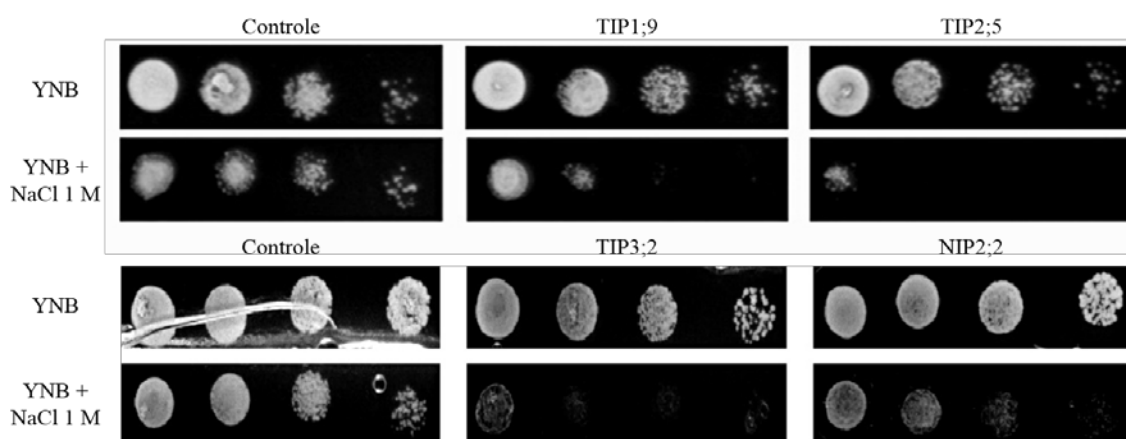


Figura 11. Ensaio de estresse osmótico em *S. cerevisiae* expressando as aquaporinas de soja GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 e GmNIP2;2 ou transformada com o pYES vazio (controle). Diluições seriadas das culturas de células (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) foram plaqueadas em meio sólido suplementado com 1 M de NaCl. As placas foram incubadas a 28 °C por 3 dias.

A sensibilidade à alta concentração de soluto fora da célula pode ser explicada através do transporte de água pelas MIPs, o que causaria uma perda mais rápida e descontrolada de água para o meio, como foi sugerido para a aquaporina de abobrinha CpNIP1 (Klebl *et al.* 2003). Alternativamente, a sensibilidade à alta osmolaridade externa pode ser devida ao efluxo de glicerol através das aquaporinas, o que impediria que a levedura concentrasse esse osmólito internamente (Pettersson *et al.* 2006). Esses resultados confirmam que as quatro aquaporinas de soja expressas em levedura localizam-se, pelo menos em parte, na membrana plasmática dessas células.

4.2.3. Ensaio de Toxicidade

Para compreender mais a respeito das possíveis funções dessas aquaporinas na soja, foram realizados ensaios para verificar se elas poderiam transportar outras substâncias já descritas na literatura como substratos para as MIPs vegetais. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa de oxigênio que pode causar danos a uma variedade de moléculas biológicas. Por outro lado, também faz parte da regulação de diversos processos fisiológicos em plantas, como fotossíntese, abertura de estômatos, ciclo celular, modificações na parede celular, senescência, entre outros (Petrov e Van Breusegem 2012). Diversas aquaporinas já foram caracterizadas pelo transporte de H_2O_2 , incluindo PIPs de milho e videira (Bienert *et al.* 2014; Sabir *et al.* 2014), TIPs de Arabidopsis, tulipa e videira (Bienert *et al.* 2014; Azad *et al.* 2012; Sabir *et al.* 2014) e NIPs de arroz (Katsuhara *et al.* 2014). Para verificar se as aquaporinas de soja são capazes de transportar essa molécula, as células de levedura transformadas com essas aquaporinas ou com o plasmídeo vazio foram expostas a um meio com duas concentrações de H_2O_2 (Fig. 12). Aquaporinas permeáveis a H_2O_2 aumentam o influxo dessa molécula para dentro das células da levedura e desencadeiam a morte celular ou inibição do crescimento.

A levedura expressando GmTIP2;5 mostrou-se extremamente sensível, evidenciando o transporte de peróxido de hidrogênio por essa aquaporina e indicando, possivelmente, maior eficiência em comparação com as outras MIPs de soja testadas. As células expressando as aquaporinas GmTIP1;9, GmTIP3;2 e GmNIP2;2 foram menos sensíveis, porém, a sensibilidade aumentou de maneira dose-dependente. O transporte dessa molécula por GmTIP1;9 e GmTIP2;5 confirma a predição realizada por Zhang *et al.* (2013) através das SDPs. O transporte de H_2O_2 através das aquaporinas para dentro do vacúolo poderia ser importante para a detoxificação da planta (Azad *et al.* 2012). Porém, considerando que não existe confirmação de que essas TIPs estejam localizadas no vacúolo, são necessários mais estudos para compreender o papel fisiológico do transporte de H_2O_2 por essas aquaporinas em soja.

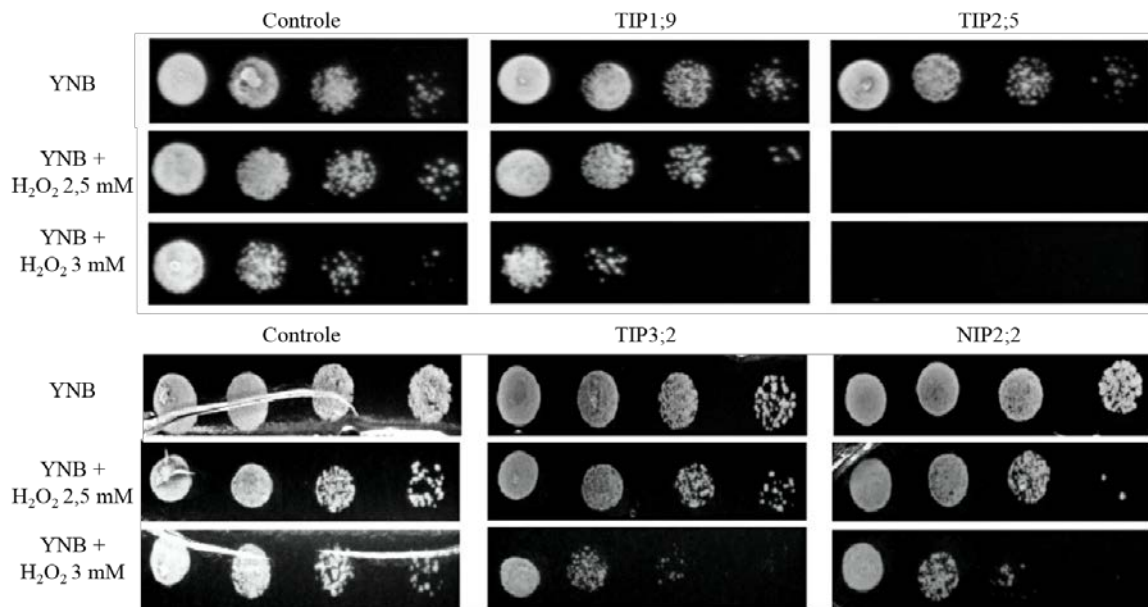


Figura 12. Ensaio de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio em *S. cerevisiae* expressando as aquaporinas de soja GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 e GmNIP2;2 ou transformada com o pYES vazio (controle). Diluições seriadas das culturas de células (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) foram plaqueadas em meio sólido suplementado com 2,5 mM ou 3,0 mM de H₂O₂. As placas foram incubadas a 28 °C por 3 dias.

O boro é um micronutriente essencial para as plantas, envolvido nos mais diversos processos fisiológicos, como metabolismo de ácidos nucleicos, carboidratos e proteínas e é necessário como componente da parede celular (Tanaka e Fujiwara 2008). Como todas as células possuem a parede celular estruturalmente semelhante, o boro precisa ser eficientemente distribuído em todos os tecidos vegetais. Além disso, esse elemento é tóxico em altas concentrações (Reid 2014). As plantas absorvem o boro do solo na forma de ácido bórico (H₃BO₃). AtNIP5;1 e AtNIP6;1 de *Arabidopsis* (Takano *et al.* 2006; Tanaka *et al.* 2008), HvPIP1;3 e HvPIP1;4 de cevada (Fitzpatrick e Reid 2009), OsNIP2;1 e Os NIP2;2; de arroz (Mitani *et al.* 2008) e VvTIP1;1 e VvTIP2;2 de videira (Sabir *et al.* 2014) foram caracterizadas como transportadores de ácido bórico. No presente estudo, nenhuma das aquaporinas mostrou-se permeável ao ácido bórico nas duas concentrações utilizadas no ensaio (Fig. 13). Concentrações maiores foram testadas, mas causaram toxicidade às células controle.

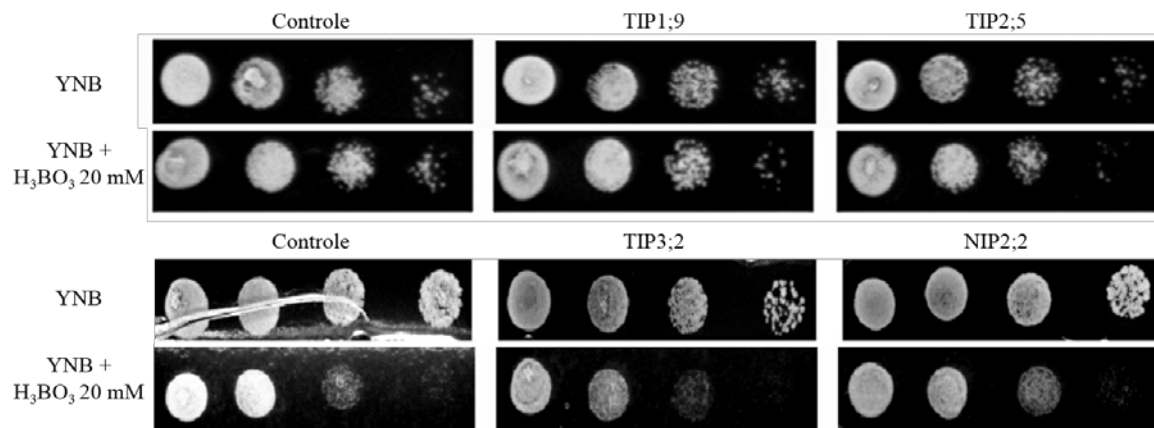


Figura 13. Ensaio de sensibilidade ao boro em *S. cerevisiae* expressando as aquaporinas de soja GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 e GmNIP2;2 ou transformada com o pYES vazio (controle). Diluições seriadas das culturas de células (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) foram plaqueadas em meio sólido suplementado com 20 mM de H₃BO₃. As placas foram incubadas a 28 °C por 3 dias.

4.2.4. Quantificação do Transporte de Água

A descoberta das aquaporinas estabeleceu as bases moleculares para a permeabilidade passiva das membranas vegetais à água (Maurel 1997). Hoje, as características do transporte de água por aquaporinas são amplamente utilizadas para explicar as propriedades hidráulicas desses organismos (Li *et al.* 2014). Existem evidências da participação das aquaporinas em processos fundamentais como divisão e expansão celular, que requer a absorção contínua de água para manutenção da pressão de turgor, absorção de água pelas raízes, osmorregulação e transpiração (Chaumont e Tyerman 2014).

Para quantificar a capacidade de transporte de água das TIPs caracterizadas, foi mensurado o coeficiente de permeabilidade osmótica da água (P_f) em leveduras transformadas com GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 ou com o plasmídeo vazio (controle). Os ensaios foram realizados em condições hipertônicas por espectroscopia de fluorescência, empregando a técnica de interrupção brusca do fluxo (*stopped-flow*). A estimativa do transporte de água através dessa técnica utilizando células intactas de *S. cerevisiae* já foi bem estabelecida (Soveral *et al.* 2007; Leitão *et al.* 2012; Sabir *et al.* 2014). As alterações de volume em função do tempo para as diferentes populações de células submetidas ao mesmo choque osmótico foram monitoradas como mudanças na intensidade da fluorescência e estão representadas na figura 14. As leveduras expressando

as TIPs de soja atingem o equilíbrio mais rapidamente que as leveduras controle, indicando que a expressão dessas aquaporinas aumenta a permeabilidade da célula à água a 10 °C. O aumento na permeabilidade em consequência da presença de aquaporinas é mais relevante em baixas temperaturas, visto que nessas condições a bicamada lipídica é mais rígida e menos permeável (Soveral *et al.* 2006). A expressão heteróloga de GmTIP1;9, GmTIP2;5 e GmTIP3;2 levou a um aumento na permeabilidade de, respectivamente, 79%, 134% e 43% em relação ao controle (Tab. 7).

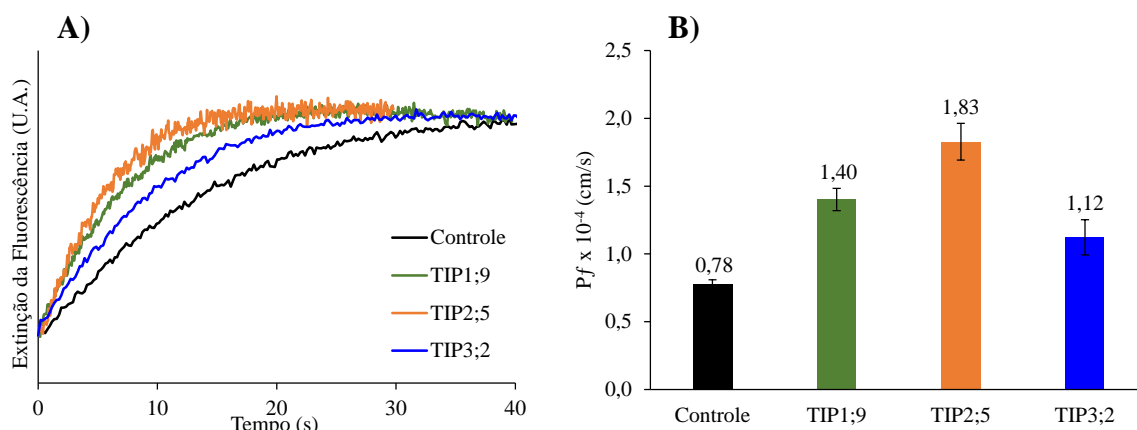


Figura 14. Ensaio de *stopped-flow* com leveduras expressando as aquaporinas de soja (GmTIP1;9, GmTIP2;5 e GmTIP3;2) ou transformadas com o pYES vazio (controle) à temperatura de 10 °C. **A)** Sinais típicos obtidos após o choque osmótico. **B)** Coeficientes de permeabilidade à água (P_f a 10 °C). Os dados exibidos representam média \pm desvio padrão de quatro sinais.

O fluxo da água através das membranas celulares é a soma da passagem das moléculas por duas vias paralelas: difusão pela bicamada lipídica (energia de ativação mais alta) ou difusão através de poros (energia de ativação mais baixa). Portanto, a energia de ativação (E_a) resultante para o transporte de água dependerá da contribuição relativa de cada via para o fluxo total (Soveral *et al.* 2006). Valores mais altos de E_a sugerem que o trajeto através dos lipídeos é o que predomina, enquanto valores mais baixos indicam a presença de aquaporinas que facilitam o transporte de água. Diferenças de mais de 2 kcal/mol são consideradas significativas. Para estimar os valores de E_a , os ensaios foram realizados em intervalos de temperatura variando dos 10 °C aos 33 °C e foram estimados os declives das representações gráficas de Arrhenius (Fig. 15).

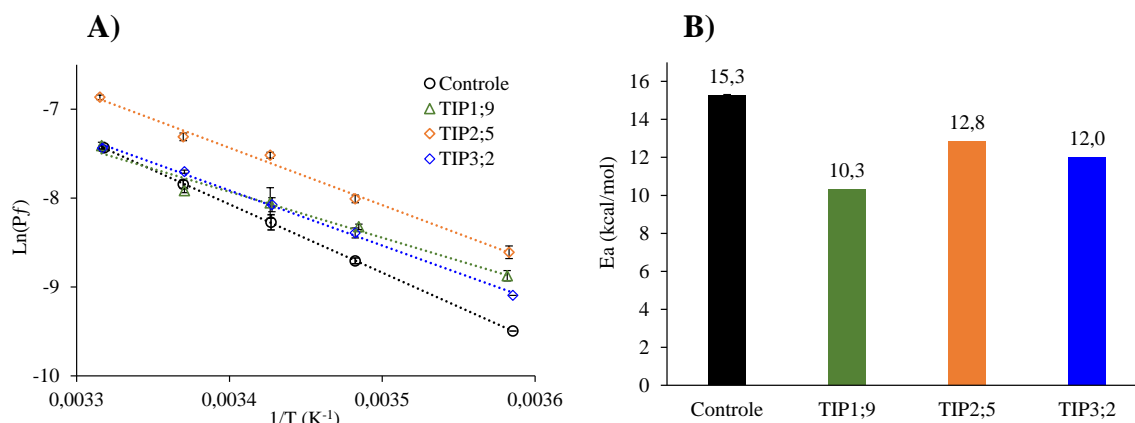


Figura 15. Energia de ativação (E_a) para o transporte de água em leveduras expressando as aquaporinas de soja (GmTIP1;9, GmTIP2;5 e GmTIP3;2) ou transformadas com o pYES vazio (controle). **A)** Gráfico de Arrhenius do P_f calculado para temperaturas entre 10 e 33 °C, onde T é a temperatura em Kelvin. **B)** E_a calculada a partir do declive exibido no gráfico de Arrhenius.

O valor de E_a obtido para o controle foi de 15,3 kcal/mol, compatível com um fluxo de água ocorrendo essencialmente através da bicamada lipídica (Soveral *et al.* 2007). A permeabilidade da bicamada depende não somente da temperatura, mas também da composição de lipídeos da membrana, de maneira que esses valores podem variar conforme o modelo considerado (Nehls e Dietz 2014). A expressão de GmTIP1;9, GmTIP2;5 e GmTIP3;2 causou uma redução na E_a de, respectivamente, 5,0, 2,5 e 3,3 kcal/mol, demonstrando que o transporte de água é menos dependente da temperatura nessas células em comparação com o controle (Tab. 7).

Tabela 7. Permeabilidade e energia de ativação para o transporte de água em *S. cerevisiae* expressando as aquaporinas de soja.

	Coeficiente de Permeabilidade (P_f) (cm/s) $\times 10^{-4}$	Energia de ativação (E_a) (kcal/mol)
Controle	$0,78 \pm 0,034$	15,3
GmTIP1;9	$1,40 \pm 0,08$	10,3
GmTIP2;5	$1,83 \pm 0,14$	12,8
GmTIP3;2	$1,12 \pm 0,13$	12,0

A expressão das MIPs de videira VvPIP2;1, VvTIP1;1, VvTIP2;1 e VvTIP2;2 em levedura leva a uma redução das energias de ativação entre 3,25 e 5,7 kcal/mol (Leitão *et al.* 2012; Sabir *et al.* 2014). Apesar de não haver diferença expressiva nas energias de

ativação, a diferença entre os valores de P_f das aquaporinas de soja e de VvTIP2;1 ($P_f=8,0\pm 0,7*10^{-4}$ cm/s; Leitão *et al.* 2012) em baixas temperaturas é considerável. Valores de P_f menos expressivos podem indicar uma menor eficiência no transporte de água por esses canais ou ser consequência de níveis de expressão mais baixos na membrana da levedura. Ainda assim, os dados preliminares apresentados indicam que todas as aquaporinas testadas são funcionais para o transporte de água.

4.2.5. Quantificação do Transporte de Ureia

Para verificar a capacidade de transporte de ureia pelas aquaporinas de soja GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 e GmNIP2;2 foi utilizada uma linhagem de *S. cerevisiae* com deleção do transportador de ureia endógeno DUR3. Células expressando as aquaporinas de interesse ou o plasmídeo vazio foram submetidas a um ensaio de *stopped-flow* utilizando uma solução com ureia 1,4 M. O emprego dessa técnica para verificação da permeabilidade à ureia foi realizado, em outros estudos, com eritrócitos ou vesículas isoladas de células animais (Zhao *et al.* 2007; Mathai e Zeidel 2007). Esse é o primeiro relato do uso de leveduras intactas para medir a permeabilidade à ureia através de *stopped-flow*. A figura 16 mostra os registros típicos do experimento para cada população de células em duas temperaturas distintas. Num primeiro momento observa-se a saída de água do interior da célula devido ao gradiente osmótico e, logo a seguir, a entrada da ureia a favor do seu gradiente de concentração.

Visto que os sinais não estabilizam durante o tempo de aquisição, não é possível ajustar uma exponencial aos traçados e derivar o k . Por conseguinte, para medir a permeabilidade relativa à ureia foi utilizado o declive (m) de cada curva referente à entrada de ureia nas células. Quanto maior a permeabilidade ao soluto, maior é a velocidade de entrada e, portanto, maior o declive dos sinais de fluorescência. A figura 17 compara os valores de permeabilidade relativa obtidos a 10 °C e a 23 °C.

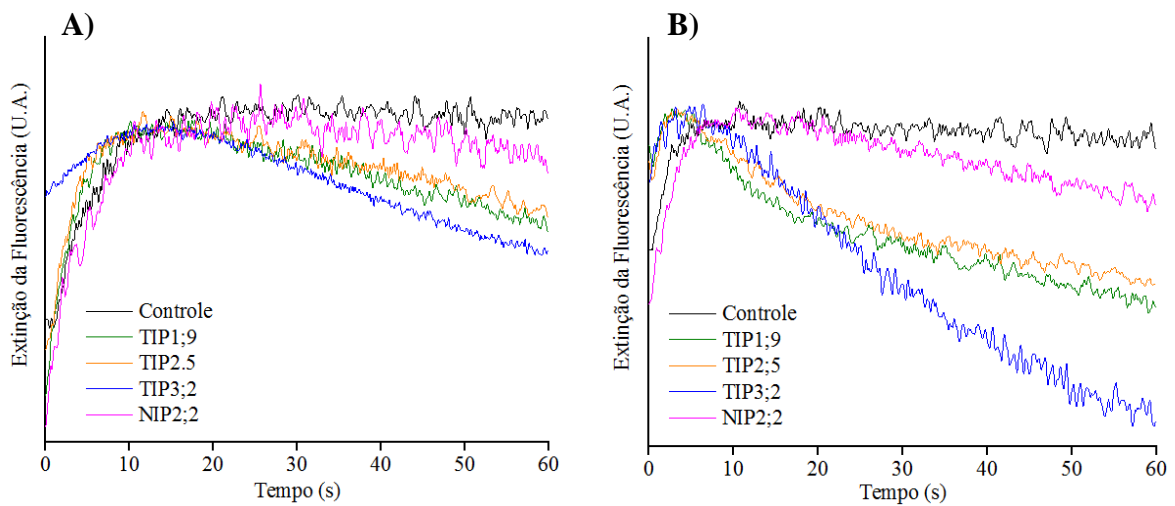


Figura 16. Sinais de fluorescência típicos obtidos para as cinco populações de células previamente equilibradas em 1,4 M de sorbitol e repentinamente expostas a uma solução com 0,7 M de sorbitol e 1,4 M de ureia a (A) 10 °C e (B) 23 °C.

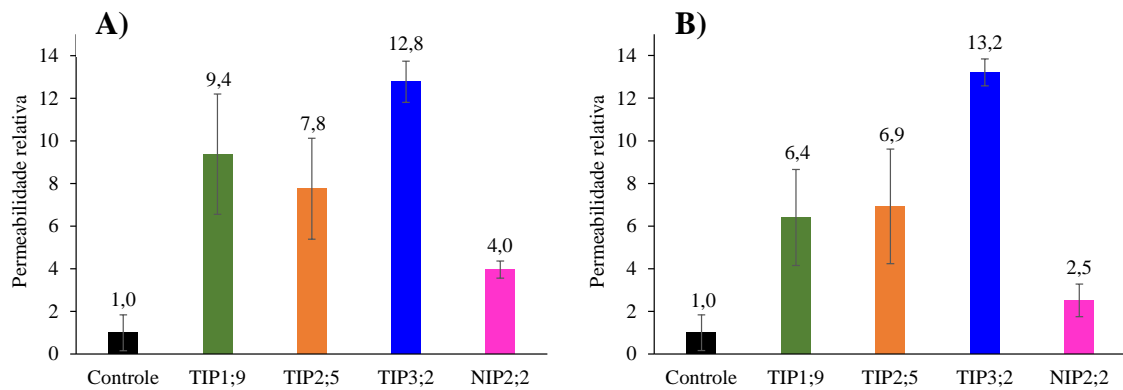


Figura 17. Permeabilidade relativa à ureia calculada a partir do declive dos sinais de fluorescência das leveduras expressando as aquaporinas de soja (GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 e GmNIP2;1) em comparação às leveduras transformadas com o pYES vazio (controle) a (A) 10 °C e (B) 23 °C. Os dados exibidos representam média \pm desvio padrão de quatro sinais.

Existe uma clara diferença na velocidade do transporte de ureia entre leveduras controle e as leveduras expressando as aquaporinas de soja, especialmente em temperaturas mais baixas. Para confirmar que a diferença observada é devido ao transporte através dos canais, os valores de m obtidos em cinco temperaturas foram utilizados para determinar a E_a para o transporte de ureia (figura 18).

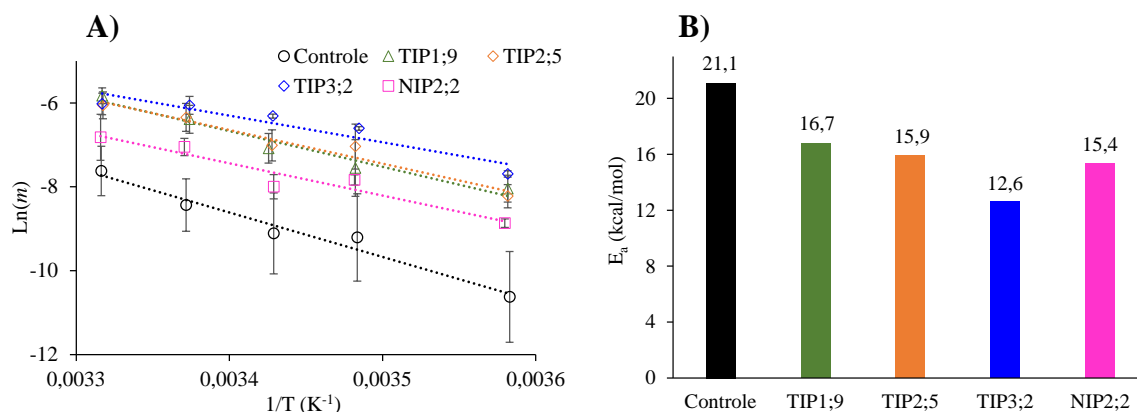


Figura 18. Energia de ativação (E_a) para o transporte de ureia em leveduras expressando as aquaporinas de soja (GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 e GmNIP2;2) ou transformadas com o pYES vazio (controle). **A)** Gráfico de Arrhenius dos valores de m calculados para temperaturas entre 10 e 33 °C, onde T é a temperatura em Kelvin. **B)** E_a para o transporte de ureia calculada a partir do declive exibido no gráfico de Arrhenius.

A expressão das quatro aquaporinas de soja levou a uma redução na energia de ativação necessária para o transporte de ureia nessas leveduras em comparação com o controle. Os dados preliminares aqui apresentados indicam que GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 e GmNIP2;2 permitem a passagem de moléculas de ureia.

4.2.6. Análise das Especificidades Estabelecidas para as Aquaporinas de Soja

A despeito das diferenças marcantes relacionadas à composição de aminoácidos e polaridade do filtro seletivo e à dimensão dos canais, as quatro aquaporinas funcionalmente caracterizadas nesse trabalho apresentaram especificidades extremamente semelhantes. Apesar de haver diferenças no grau de sensibilidade ou permeabilidade às moléculas testadas em leveduras transformadas com cada aquaporina, não é possível discernir se essa observação é decorrente de eficiências de transporte distintas ou é consequência de níveis de expressão possivelmente desiguais na membrana celular. Essa questão poderá ser resolvida através da fusão dessas proteínas com uma molécula fluorescente, como GFP, que permita acessar suas localizações na levedura e comparar níveis de expressão.

As regiões consideradas de maior importância para a seletividade das aquaporinas são, normalmente, o filtro seletivo e os motivos NPA. De acordo com essa observação, as análises realizadas a partir dos modelos estruturais revelaram que, de modo geral, esses são

os pontos mais estreitos do canal. Como mencionado anteriormente, os valores de raio calculados são somente aproximações, por apresentarem como base modelos estruturais de qualidades variadas. Além disso, existe a possibilidade desses poros, quando inseridos na membrana, apresentem certa flexibilidade, variando ligeiramente suas dimensões. Outro fator importante refere-se à orientação das cadeias laterais dos aminoácidos em contato com o lúmen do poro. Os modelos passaram por etapas de minimização de energia como parte do protocolo de modelagem, o que pode alterar orientações desfavoráveis para as cadeias laterais em relação ao cristal. Ainda assim, uma série de conformações são possíveis e podem influenciar a medida do canal. Corroborando essa concepção, Dynowski *et al.* (2008) postulam que não somente a natureza dos resíduos componentes do filtro seletivo, mas também sua exata posição e orientação parecem ser críticas para o transporte. A obtenção de diferentes confôrmeros de aquaporinas por dinâmica molecular poderia responder com maior precisão questões a respeito das dimensões dos poros. A principal dificuldade referente a essa estratégia é o alto custo computacional para realização de múltiplas simulações de proteínas inseridas em membranas.

Apesar de todos os fatores mencionados, a determinação do perfil de raio ao longo dos canais mostrou-se uma abordagem adequada para predição da permeação de ureia através aquaporinas: GmTIP3;2 é permeável à ureia, a maior molécula testada (2,62 Å; Hove e Bhave 2011), apresentando raio mínimo de 2,4 Å na região do filtro. Diferentemente do que acontece para outros substratos, a grande diversidade de aquaporinas capazes de transportar ureia torna difícil a identificação de uma assinatura de sequência que seja indicativa dessa atividade (Hove e Bhave 2011). Além disso, a hidrofobicidade do poro, por si só, também não é suficiente para determinar a permeabilidade a essa molécula em MIPs (Kojima *et al.* 2006). Estudos *in vitro* e *in silico* com mutantes da AQP1 e da SoPIP2;1 apontam o tamanho do poro como fator mais crítico para a capacidade de transporte de ureia (Beitz *et al.* 2006; Dynowski *et al.* 2008). A heterogeneidade de filtros seletivos das quatro aquaporinas de soja caracterizadas por esse transporte confirma essas observações.

Nenhuma das aquaporinas caracterizadas permitiu a passagem de ácido bórico, ainda que essa molécula seja bastante similar à ureia em termos de tamanho (2,57 Å; Hove e Bhave 2011), indicando que o tamanho do poro não é suficiente para prever a permeabilidade ao ácido bórico. Nesse caso, a polaridade do filtro também é importante

para criação de um ambiente hidrofílico adequado para esse transporte (Hove e Bhave 2011). Considerando que GmTIP2;5 e GmTIP3;2 possuem tanto polaridade como dimensões apropriadas nessa região, é possível deduzir que existam ainda outras áreas da proteína importantes nesse processo.

A molécula de peróxido de hidrogênio possui várias características físico-químicas muito semelhantes à água, como tamanho, propriedades eletroquímicas e capacidade de formação de ligações de hidrogênio, o que a torna uma forte candidata a substrato típico para aquaporinas (Bienert *et al.* 2014). Em conformidade com essas propriedades, as quatro aquaporinas de soja mostraram alguma permeabilidade tanto à água quanto ao peróxido de hidrogênio.

Os ensaios funcionais confirmaram as previsões baseadas na análise das SDPs realizadas por (Zhang *et al.* 2013), em que o transporte de peróxido de hidrogênio foi previsto para GmTIP1;9 e GmTIP2;5, e o transporte de ureia para GmTIP3;2 e GmNIP2;2. Porém, não foi possível prever, unicamente através das SDPs, o transporte de peróxido de hidrogênio e de ureia para todas as aquaporinas, indicando que resultados negativos, nesse caso, devem ser considerados com cautela. No caso de GmNIP2;2, a verificação das SDPs tampouco foi capaz de prever o transporte de silício demonstrado *in vitro* por Deshmukh *et al.* (2013).

Para que as estratégias de predição de transporte sejam mais precisas, é importante a obtenção das estruturas cristalográficas de outras subfamílias de aquaporinas vegetais além da PIP, de maneira a permitir modelagens mais acuradas e simulações de dinâmica molecular da permeação dos diversos substratos descritos para essas proteínas. Através dessa abordagem, será possível a identificação dos resíduos mais importantes para a passagem de cada molécula e a caracterização das interações que ocorrem durante o transporte, sejam elas interações proteína-proteína ou proteína-substrato.

4.2.7. Perfil de Expressão em Soja

O perfil de expressão das aquaporinas GmTIP1;9 e GmTIP2;5 foi analisado em plantas de soja cultivadas em hidroponia até o período de um mês. Iniciadores específicos foram desenhados para cada uma, de maneira que somente uma banda, do tamanho

esperado (344 pares de base para GmTIP1;9 e 521 pares de base para GmTIP2;5) é observada nos géis (Fig. 19).

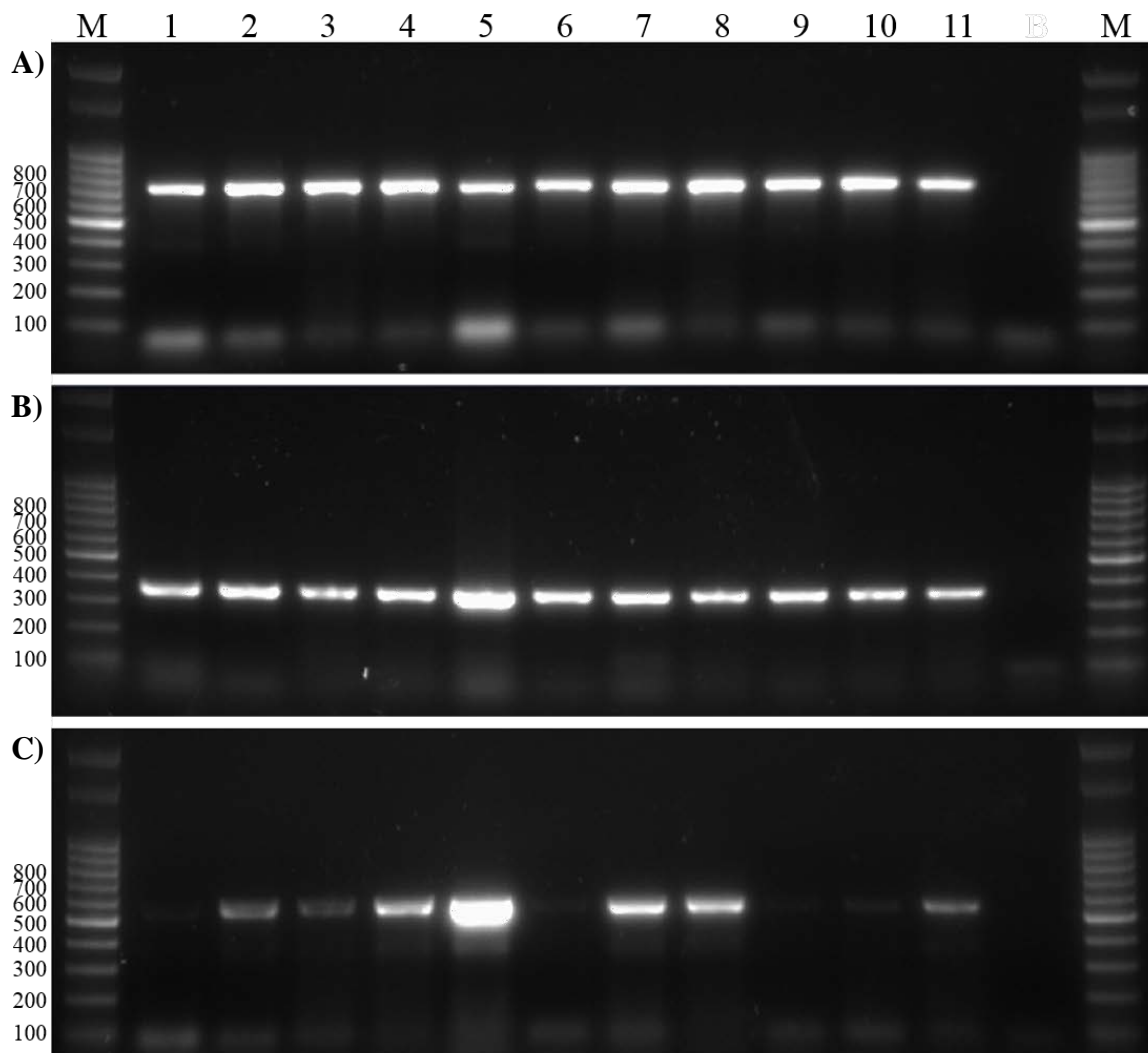


Figura 19. Perfil de expressão de aquaporinas de soja. (A) Gene controle (actina), (B) GmTIP1;9 e (C) GmTIP2;5. M, Marcador molecular; 1, Semente quiescente; 2, Semente germinada; 3, Radícula de três dias; 4, Hipocótilo de três dias; 5, Cotilédone de três dias; 6, Raiz de sete dias; 7, Caule de sete dias; 8, Folha de sete dias; 9, Raiz de um mês; 10, Caule de um mês; 11, Folha de um mês. Os valores à esquerda indicam o número de pares de bases relacionados à respectiva banda do marcador molecular.

GmTIP1;9 aparece como um proteína ubíqua, com expressão similar em todas as amostras avaliadas. Esse resultado confirma a análise de Deshmukh *et al.* (2013), que averiguaram o perfil de expressão das aquaporinas em soja utilizando dados de transcriptoma e microarranjo, mas contrasta com as observações de Zhang *et al.* (2013), que demonstram que esse gene é expresso somente em caule e folhas. É importante

ressaltar que esses autores, além de não empregarem o sistema hidropônico para o cultivo das plantas de soja, utilizaram o cultivar Sudou 3, enquanto no presente estudo utilizamos Williams 82. Deshmukh *et al.* (2013) não deixam claro qual o cultivar utilizado nas análises. Diferenças na expressão de aquaporinas entre cultivares já foi demonstrada para outras espécies, como pêssogo (*Prunus persica*; Yooyongwech *et al.* 2008) e morango (*Fragaria x ananassa*; Alleva *et al.* 2010).

GmTIP2;5 também aparece em todos os tecidos, porém foram encontradas diferenças nos níveis de expressão entre as amostras analisadas. Observa-se maior expressão desse gene em folhas e caule, e essa expressão diminui ao longo do desenvolvimento da planta. Também foi encontrada maior expressão na semente germinada do que na semente quiescente. Esse perfil corrobora os dados obtidos por Deshmukh *et al.* (2013), em que não é detectada expressão de GmTIP2;5 em sementes de 42 dias após o florescimento, mas é observada em estágios anteriores do desenvolvimento da semente, e menor expressão é encontrada em raízes em comparação com folhas.

Análises do perfil de expressão das aquaporinas GmTIP3;2 e GmNIP2;2 estão em andamento. Estudos de qPCR indicam que GmNIP2;2 está presente nas raízes de soja de três cultivares distintos (Deshmukh *et al.* 2013), incluindo Williams 82. Outros órgãos não foram avaliados pelos autores, mas dados de transcriptoma determinam maior expressão em raízes, nódulos, folhas e flores, e uma pesquisa em bases de dados de microarranjo apontam sua expressão na epiderme da soja. Para GmTIP3;2, resultados de transcriptoma indicam sua expressão apenas em sementes (Deshmukh *et al.* 2013).

Parte III

Envolvimento das Aquaporinas no Metabolismo de Ureia

4.3.2. Envolvimento das Aquaporinas no Metabolismo de Ureia

A grande maioria dos estudos referentes à aquisição de nitrogênio pelas plantas são focados na absorção e assimilação de nitrato ou amônio (Nacry *et al.* 2013). Somente nos últimos anos, os aspectos relacionados ao transporte de ureia começaram a receber mais atenção. A absorção de ureia pelas células vegetais como uma molécula intacta já foi demonstrada anteriormente (Kojima *et al.* 2007) e independe do status nutricional da planta (Mérigout, Lelandais, *et al.* 2008). Plantas de *Arabidopsis* previamente cultivadas na presença de ureia, quando expostas a uma solução nutritiva contendo ureia marcada com nitrogênio-15, absorvem essa molécula de maneira mais eficiente que plantas previamente cultivadas em outras fontes de nitrogênio. Esse dado sugere que a exposição das raízes à ureia deve levar a um aumento da expressão de transportadores responsáveis pela sua absorção (Mérigout, Lelandais, *et al.* 2008).

O único transportador de ureia que teve sua importância comprovada para fisiologia da planta foi a proteína DUR3, identificada na membrana plasmática de células de raízes de *Arabidopsis* (Kojima *et al.* 2007). Utilizando a sequência de AtDUR3, foi identificado no genoma da soja um homólogo dessa proteína. Uma análise através do servidor TMHMM prediz a existência de 15 hélices transmembrana em ambas as proteínas, que apresentam 78,2% de identidade. Linhagens de *Arabidopsis* que não possuem o gene de DUR3 funcional não crescem bem em baixas concentrações de ureia como a única fonte de nitrogênio, demonstrando a importância desse transportador de alta-afinidade para a assimilação desse nutriente. Porém, em concentrações acima de 1 mM, o crescimento das plantas é menos prejudicado pela mutação. Além disso, a quantidade de ureia nas raízes das plantas mutantes diminui drasticamente, em relação ao controle, quando cultivadas em solução nutritiva contendo até 100 µM de ureia. Mas, quando a solução é suplementada com concentrações acima de 1 mM, essa diferença é significativamente menor, sugerindo a contribuição de sistemas de transporte de baixa afinidade, como aquaporinas, para a absorção da ureia presente no meio externo.

Para investigar a participação das aquaporinas de soja permeáveis à ureia na absorção e transporte dessa molécula na planta, foi utilizada uma abordagem baseada em PCR quantitativo. Plantas de soja foram cultivadas em solução nutritiva contendo sulfato de amônio ou ureia como a única fonte de nitrogênio, com o propósito de investigar

possíveis diferenças, entre os dois tratamentos, na expressão gênica das MIPs. A estabilidade da ureia em soluções nutritivas foi testada anteriormente, demonstrando que a hidrólise dessa molécula nessas condições é praticamente nula (Mérigout, Gaudon, *et al.* 2008; Kutman *et al.* 2014).

Não foram observadas diferenças fenotípicas entre os tratamentos (Fig. 20). Em *Arabidopsis*, as plantas cultivadas em ambas as condições apresentam sinais de deficiência de nitrogênio e um perfil muito similar de aminoácidos nas raízes (Mérigout, Lelandais, *et al.* 2008). Além disso, existem evidências de que o amônio derivado internamente através da clivagem da ureia é utilizado da mesma maneira que o amônio absorvido pela planta do ambiente externo. Tais semelhanças devem minimizar a complexidade dos processos avaliados e, portanto, diminuir as chances de equívocos na interpretação dos resultados, que ocorreriam mais facilmente caso outras rotas metabólicas fossem ativadas, como ocorre, por exemplo, com o uso de nitrato (Mérigout, Lelandais, *et al.* 2008).

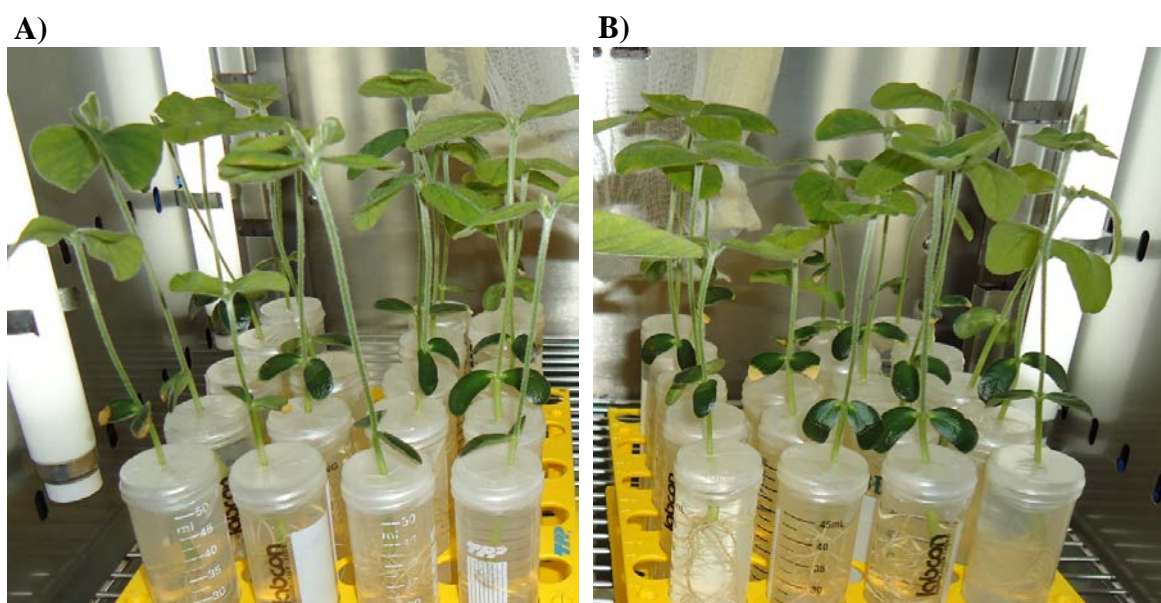


Figura 20. Fenótipo das plântulas de soja cultivadas em (A) ureia e (B) sulfato de amônio.

Os transcritos de GmTIP1;9, GmTIP3;2 e GmNIP2;2 tiveram sua expressão significativamente aumentada em raízes de soja no primeiro dia de tratamento com ureia (Fig. 21). Esse padrão sugere uma adaptação da planta à nova fonte de nitrogênio fornecida, de maneira a absorver mais eficientemente a ureia presente na solução nutritiva e a lidar com a necessidade de transporte dessa molécula através das membranas intracelulares. O aumento da expressão de GmNIP2;2 na parte aérea da soja, observado no

sétimo dia de tratamento, indica uma possível função no traslado da ureia entre os órgãos da planta. O transporte de ureia da raiz para a parte aérea foi observado em plantas de arroz, abobrinha e soja cultivadas em privação de níquel, elemento necessário para a ativação da urease, causando o acúmulo de grande quantidade de ureia na parte aérea dessas plantas (Gerendás e Sattelmacher 1997; Gerendás *et al.* 1998; Kutman *et al.* 2014). Em trigo cultivado em hidroponia na presença de ureia, a concentração dessa molécula também aumenta progressivamente na parte aérea (Mérigout, Gaudon, *et al.* 2008). Entre as quatro aquaporinas testadas, GmTIP2;5 foi a única que não teve sua expressão afetada, sugerindo que, apesar de ser permeável à ureia, essa aquaporina desempenhe outras funções em soja ou tenha sua expressão regulada em condições, órgãos ou estágios de desenvolvimento não testados nesse estudo. Não é possível afirmar se essas aquaporinas estão envolvidas no transporte através da membrana plasmática ou entre as diversas organelas vegetais. Segundo as predições realizadas através dos diferentes servidores, enquanto GmNIP2;2 tem mais probabilidade de estar inserida na membrana plasmática, a localização das TIPs caracterizadas parece estar mais relacionada a membranas intracelulares. Foi proposto que a compartimentalização da ureia no vacúolo pode ser benéfica para estocar transientemente ou detoxificar um excesso de ureia que, do contrário, seria acumulada no citoplasma. Corroborando essa hipótese, a ureia borrifada como fertilizante em folhas de batata permanece internamente nos tecidos após 36 horas, apesar da presença de urease suficiente no citoplasma para que a degradação ocorresse em apenas algumas horas (Witte 2011). Mais estudos são necessários para determinar o perfil de expressão e a localização subcelular das aquaporinas testadas, de maneira a melhor compreender suas funções no metabolismo de ureia na soja.

O transporte de ureia através de membranas celulares é essencial em muitos processos fisiológicos e, portanto, deve requerer diferentes tipos de transportadores (Gu *et al.* 2012). Para verificar se existe variação da expressão de outras isoformas de aquaporinas que podem apresentar essa função, foram desenhados iniciadores específicos para amplificação do cDNA de MIPs de soja que apresentam altos níveis de similaridade com aquaporinas transportadoras de ureia de outras espécies vegetais: NtAQP1 (Eckert *et al.* 1999), ZmPIP1;5b (Gaspar *et al.* 2003), CpNIP1 (Klebl *et al.* 2003), AtTIP1;1, AtTIP1;2, AtTIP2;1 e AtTIP4;1 (Liu, Ludewig, Gassert, *et al.* 2003), AtNIP6;1 (Wallace e Roberts 2005), AtTIP1;3 e AtTIP5;1 (Soto *et al.* 2008) e OsNIP2;1 (Mitani *et al.* 2008).

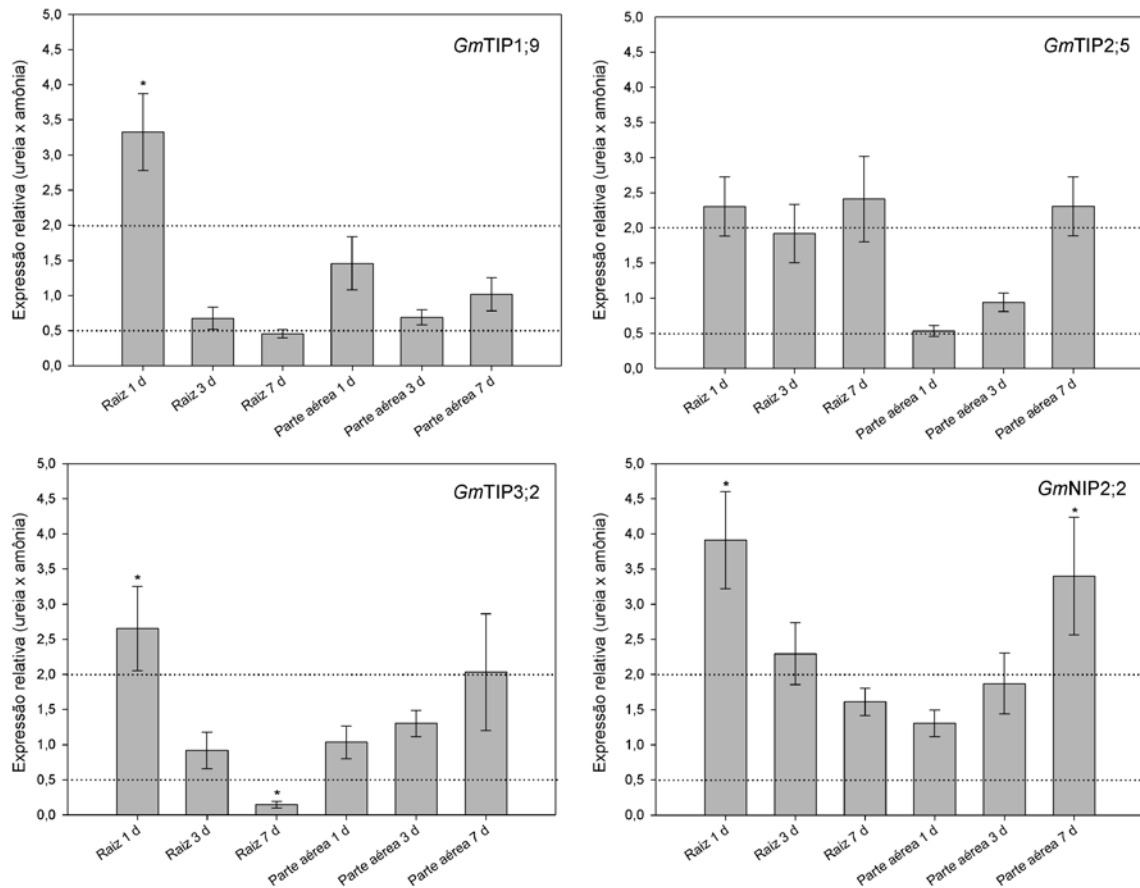
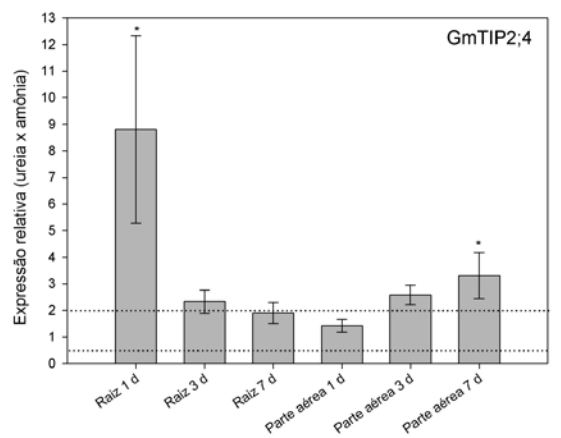
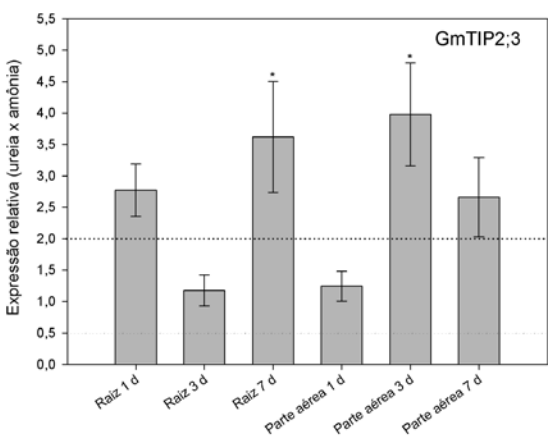
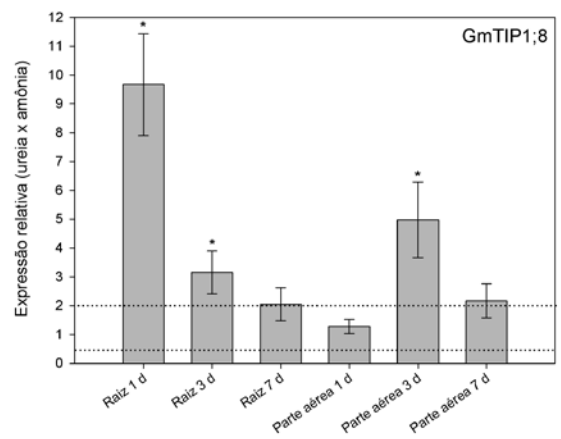
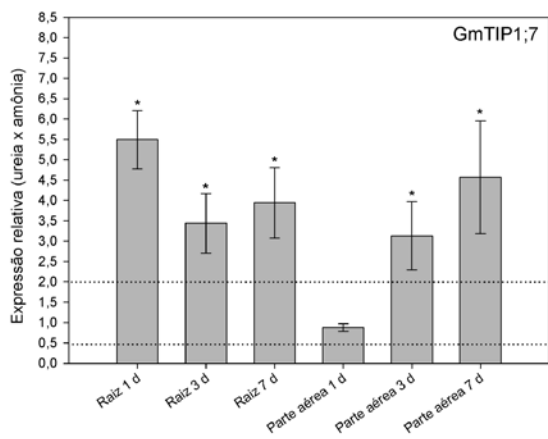
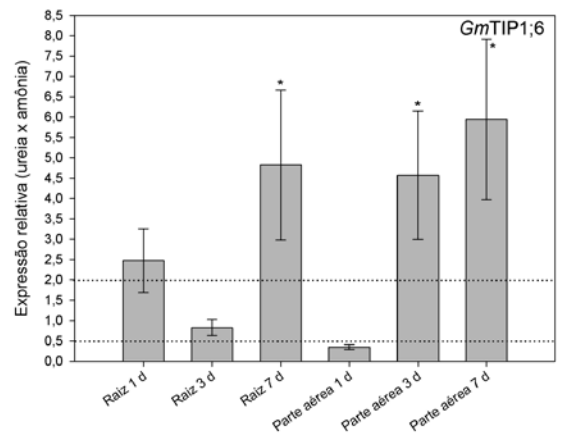
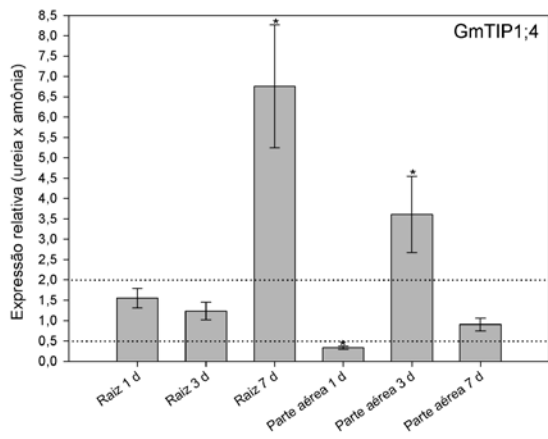
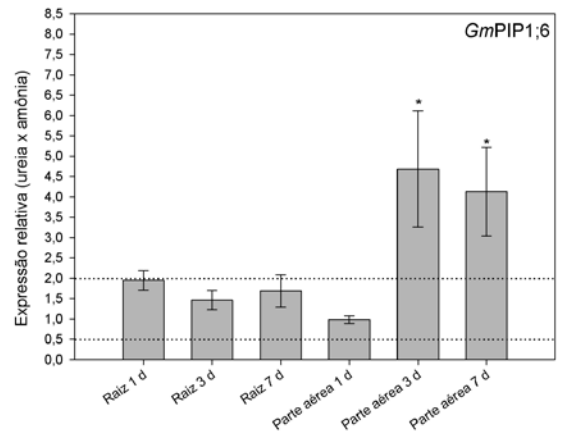
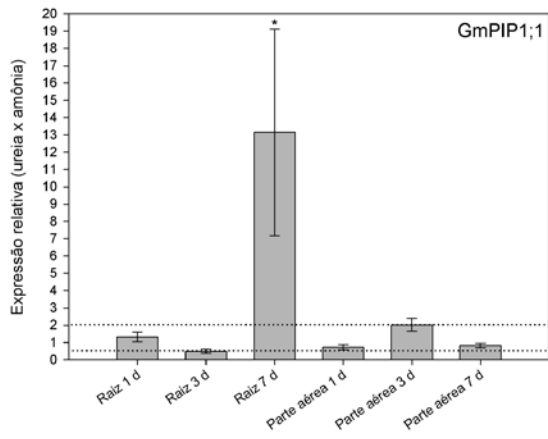


Figura 21. Expressão relativa dos transcritos de aquaporinas de soja em raízes e parte aérea de plântulas cultivadas em ureia como única fonte de nitrogênio. Plântulas foram cultivadas por 7 dias em uma solução com sulfato de amônio e então submetidas a solução nutritiva com ureia por um, três ou sete dias. A quantidade inicial de RNA em cada amostra foi normalizada com os genes controle MTP e Fbox. Os dados são relativos aos níveis de expressão na planta controle (cultivada em sulfato de amônio), que foram fixados em 1. As barras representam média \pm desvio padrão. * indicam médias estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

Quando a soja é cultivada em ureia como a única fonte de nitrogênio, as diferentes isoformas de aquaporinas apresentam padrões de regulação distintos (Tab. 8 e Fig. 22). Contudo, de maneira geral, os níveis de transcritos sofrem um aumento em relação ao controle, tanto em raízes quanto na parte aérea, indicando o envolvimento desses canais no metabolismo de ureia na planta. Entre as alterações mais significativas, está o aumento da expressão de GmNIP2;1 em raízes e de GmTIP4;2 na parte aérea. Considerando a elevada identidade de sequência entre GmNIP2;1 e GmNIP2;2 (96,9%) e a presença dos mesmos resíduos no filtro seletivo, motivos NPA e SDPs, é muito provável que GmNIP2;1 também seja permeável a ureia.



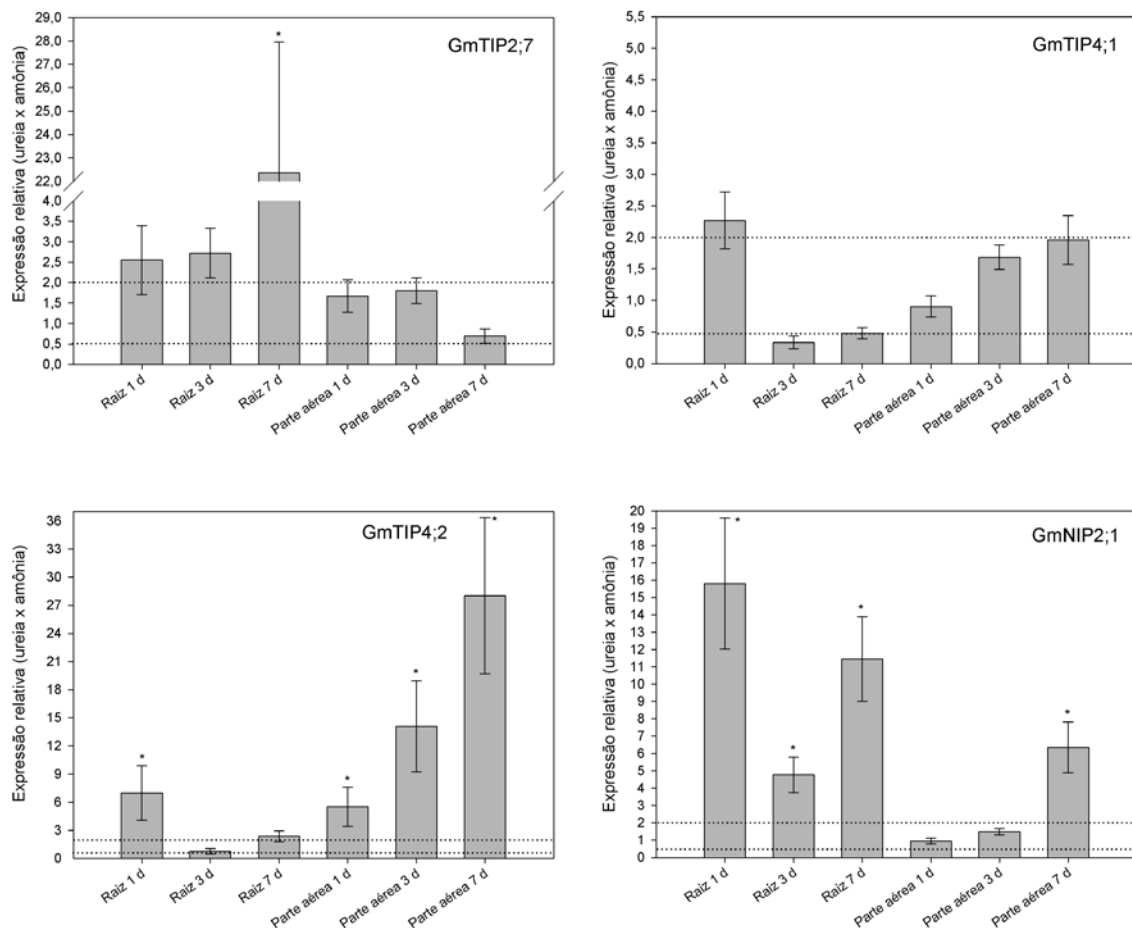


Figura 22. Expressão relativa dos transcritos de aquaporinas de soja em raízes e parte aérea de plântulas cultivadas em ureia como única fonte de nitrogênio. Plântulas foram cultivadas por 7 dias em uma solução com sulfato de amônio e então submetidas a solução nutritiva com ureia por um, três ou sete dias. A quantidade inicial de RNA em cada amostra foi normalizada com os genes controle MTP e Fbox. Os dados são relativos aos níveis de expressão na planta controle (cultivada em sulfato de amônio), que foram fixados em 1. As barras representam média \pm desvio padrão. * indicam médias estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

Há alguns anos, imaginava-se que a ureia era um substrato pouco comum para aquaporinas. Porém, em animais vertebrados, de 21 aquaporinas testadas, 15 transportam ureia e, em plantas, de 20 aquaporinas testadas, 17 apresentam essa propriedade, incluindo PIPs, TIPs e NIPs (Perez Di Giorgio *et al.* 2014). Assim como foi proposto para a característica permeabilidade à água (Kaldenhoff *et al.* 2007), esse sistema deve garantir o ajuste fino do transporte de ureia na planta, com diferenças nas localizações subcelulares, tecidos e órgãos e na regulação da expressão sob diversas circunstâncias. Um estudo realizado com a aquaporina permeável a ureia AtTIP4;1 apresenta uma evidência que sustenta essa hipótese. Essa MIP, quando superexpressa, aumenta a absorção dessa

molécula em folhas embebidas em uma solução com ureia marcada com carbono-14, mas, quando silenciada, não causa redução do transporte em comparação com folhas controle, indicando que exista redundância funcional para compensar a falta desse homólogo (Kim *et al.* 2008). Outros estudos baseados em plantas nocaute para aquaporinas individuais também mostram-se de difícil interpretação, já que nenhum fenótipo óbvio foi demonstrado para esses mutantes. Entre as hipóteses que explicam esses resultados, podemos citar a grande diversidade de genes de aquaporinas e possíveis mecanismos de compensação entre homólogos próximos (Chaumont e Tyerman 2014). O aumento da expressão em resposta à presença de ureia observado em quatorze aquaporinas de soja gera mais uma evidência a favor dessa hipótese.

Tabela 8. Expressão relativa dos transcritos de aquaporinas de soja em raízes e parte aérea de plântulas cultivadas em ureia como única fonte de nitrogênio.

	Raiz			Parte aérea		
	1 dia	3 dias	7 dias	1 dia	3 dias	7 dias
GmNIP2;1	15,80 ± 3,78	4,76 ± 1,02	11,44 ± 2,44	0,95 ± 0,17	1,49 ± 0,17	6,35 ± 1,47
GmPIP1;1	1,32 ± 0,28	0,49 ± 0,12	13,15 ± 5,97	0,74 ± 0,15	2,02 ± 0,36	0,82 ± 0,13
GmPIP1;6	1,95 ± 0,24	1,46 ± 0,24	1,69 ± 0,40	0,99 ± 0,09	4,69 ± 1,42	4,13 ± 1,09
GmTIP1;4	1,55 ± 0,24	1,24 ± 0,21	6,76 ± 1,51	0,34 ± 0,04	3,61 ± 0,94	0,90 ± 0,16
GmTIP1;6	2,47 ± 0,78	0,83 ± 0,20	4,82 ± 1,84	0,35 ± 0,06	4,57 ± 1,58	5,94 ± 1,97
GmTIP1;7	5,49 ± 0,72	3,44 ± 0,73	3,94 ± 0,86	0,88 ± 0,09	3,13 ± 0,84	4,56 ± 1,38
GmTIP1;8	9,66 ± 1,77	3,16 ± 0,74	2,05 ± 0,58	1,28 ± 0,24	4,97 ± 1,31	2,16 ± 0,59
GmTIP2;3	2,77 ± 0,42	1,18 ± 0,25	3,62 ± 0,88	1,24 ± 0,24	3,98 ± 0,82	2,66 ± 0,63
GmTIP2;4	8,80 ± 3,52	2,33 ± 0,43	1,90 ± 0,40	1,42 ± 0,24	2,58 ± 0,37	3,32 ± 0,87
GmTIP2;7	2,55 ± 0,84	2,72 ± 0,61	22,36 ± 5,59	1,67 ± 0,39	1,80 ± 0,31	0,70 ± 0,17
GmTIP4;1	2,26 ± 0,45	1,68 ± 0,19	0,48 ± 0,09	0,90 ± 0,17	1,68 ± 0,19	1,96 ± 0,39
GmTIP4;2	6,98 ± 2,90	0,77 ± 0,27	2,36 ± 0,58	5,51 ± 2,09	14,10 ± 4,86	28,03 ± 8,31

Plântulas foram cultivadas por 7 dias em uma solução com sulfato de amônio e então submetidas a solução nutritiva com ureia por um, três ou sete dias. A quantidade inicial de RNA em cada amostra foi normalizada com os genes controle MTP e Fbox. Os dados são relativos aos níveis de expressão na planta controle (cultivada em sulfato de amônio), que foram fixados em 1. Os números representam média ± desvio padrão da razão entre expressão nas plantas crescidas em ureia em relação as plantas crescidas em sulfato de amônio. Os experimentos foram realizados em quadruplicada. Valores em azul ou vermelho indicam, respectivamente, diminuição ou aumento da expressão em comparação com a planta controle, considerando os limites de 0,5 e 2,0.

Para verificar uma possível relação entre os níveis de expressão das aquaporinas envolvidas no metabolismo de ureia e as ureases, foram desenhados iniciadores específicos

para as isoformas de urease presentes em soja. Não houve diferença significativa na expressão dos genes de urease ubíqua (Fig. 23). A urease embrião-específica foi detectada somente na raiz de 3 dias e nenhuma diferença nos níveis de expressão entre os tratamentos foi observada.

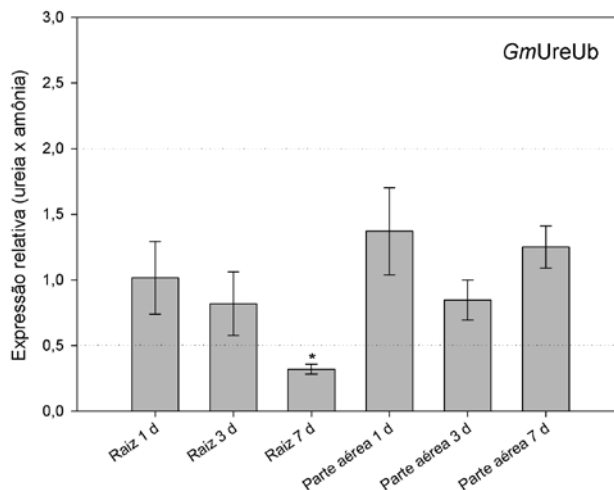


Figura 23. Expressão relativa dos transcritos da urease ubíqua de soja em raízes e parte aérea de plântulas cultivadas em ureia como única fonte de nitrogênio. Plântulas foram cultivadas por 7 dias em uma solução com sulfato de amônio e então submetidas a solução nutritiva com ureia por um, três ou sete dias. A quantidade inicial de RNA em cada amostra foi normalizada com os genes controle MTP e Fbox. Os dados são relativos aos níveis de expressão na planta controle (cultivada em sulfato de amônio), que foram fixados em 1. As barras representam média \pm desvio padrão. * indicam médias estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

Resultados similares foram obtidos em um estudo de transcriptoma com plantas de *Arabidopsis* cultivadas em ureia, em comparação ao cultivo em nitrato de amônio (Mérigout, Lelandais, *et al.* 2008). Em arroz e batata, tampouco foram encontradas evidências para o aumento da atividade ureásica após cultivo em solução com ureia ou fertilização foliar (Witte *et al.* 2002; Cao *et al.* 2010), indicando que as células vegetais possuem urease suficiente para processar a ureia importada, mesmo em altas concentrações externas (Witte 2011). O único indício relatado de que a atividade ureásica pode ser controlada, nesses casos, foi o aumento da expressão da proteína acessória UreG, necessária para a ativação da urease, em *Arabidopsis* cultivada em sistema hidropônico contendo somente ureia como fonte de nitrogênio (Mérigout, Lelandais, *et al.* 2008).

Considerando que a urease está presente em níveis suficientes para lidar com a degradação da ureia transportada, outros processos devem limitar o crescimento de plantas

quando cultivadas em ureia como a única fonte de nitrogênio. A razão pela qual essas plantas apresentam sinais de deficiência de nitrogênio nessas condições ainda não é clara e gera controvérsias na literatura. Enquanto alguns estudos apontam, como a principal causa desses sintomas, uma absorção e/ou assimilação menos eficiente, mas ainda ativa, dessa forma de nitrogênio (Mérigout, Lelandais, *et al.* 2008), outros sugerem que a reduzida performance das plantas nessas condições seja consequência de um desequilíbrio na distribuição do nitrogênio após a sua assimilação (Cao *et al.* 2010).

Mais estudos precisam ser realizados para ampliar a compreensão acerca do metabolismo de ureia em plantas. Os resultados aqui apresentados confirmam o envolvimento das aquaporinas nesse processo, demonstrando, além da sua permeabilidade a ureia, sua capacidade de responder à disponibilidade dessa substância. Esses dados apontam as aquaporinas como promissores alvos para engenharia genética e para o desenvolvimento de estratégias que visem o melhoramento da produção agrícola.

5. Conclusões e Perspectivas

Nesse estudo, identificamos a presença de 66 genes completos de aquaporinas no genoma da soja, divididos em 5 subfamílias. A família de MIPs em soja possui número expressivo de membros e é bastante diversificada, o que deve garantir a capacidade da planta em realizar o transporte de moléculas importantes, como água e nutrientes, e responder à diferentes alterações do ambiente. Nossos resultados corroboram em grande parte os resultados obtidos por Zhang *et al.* (2013) e Deshmukh *et al.* (2013). Algumas divergências residem no número de genes identificados, na identificação de resíduos conservados e na classificação das sequências em subgrupos.

Apesar do aumento do número de aquaporinas de plantas funcionalmente caracterizadas nos últimos anos, pouco se sabe sobre as bases moleculares do transporte de diferentes solutos, o que torna difícil a predição das funções desses canais. A análise das sequências e das estruturas tridimensionais das MIPs de soja apresentada nesse estudo, juntamente com a identificação das moléculas que podem ser transportadas por cada aquaporina, pode contribuir para a geração de estratégias mais claras de predição das suas especificidades. A estrutura cristalográfica de membros de outras subfamílias, além da PIP, e simulações de dinâmica molecular da permeação de água e solutos para esses canais também são importantes para aprimorar o conhecimento acerca das bases moleculares do transporte de moléculas realizado por essa família tão variada de proteínas.

A abordagem mais utilizada para a compreensão dos papéis das MIPs em plantas é a caracterização individual de membros. As aquaporinas GmTIP1;9, GmTIP2;5, GmTIP3;2 e GmNIP2;2 foram submetidas a um ensaio de complementação em leveduras, confirmando a funcionalidade dos canais. O transporte de solutos biologicamente relevantes, como peróxido de hidrogênio e ácido bórico, está bem estabelecido na literatura e tem vinculado as aquaporinas a diversas funções, como respostas a estresse oxidativo e nutrição mineral. Nesse trabalho, através de um teste de sensibilidade em leveduras, mostramos a capacidade de transporte de peróxido de hidrogênio das quatro aquaporinas testadas, porém nenhuma mostrou-se permeável ao ácido bórico. Além disso, dados preliminares de espectroscopia de fluorescência utilizando células intactas de *S. cerevisiae* indicam que GmTIP1;9, GmTIP2;5 e GmTIP3;2 são capazes de transportar água. Para mensurar essa capacidade, os ensaios serão repetidos e as proteínas serão fusionadas a uma

molécula fluorescente, como GFP, de maneira a quantificar os níveis de expressão das aquaporinas na membrana da levedura. Cinco aquaporinas de outros subgrupos já foram clonadas e serão submetidas a ensaios funcionais.

O uso de ureia como fertilizante nitrogenado ocorre mundialmente em sistemas agrícolas, inclusive em soja. Apesar disso, poucos transportadores responsáveis pela absorção/transporte dessa molécula foram caracterizados em plantas e não há relato da caracterização de nenhum transportador de ureia em soja. No presente estudo, quatro genes de aquaporinas permeáveis a ureia foram identificados através da técnica de *stopped-flow*. Esses ensaios também serão repetidos com a fusão dos genes à GFP, permitindo a comparação entre os níveis de expressão na membrana plasmática da levedura. Para acessar a possível relação das aquaporinas de soja com o metabolismo de ureia na planta, foi utilizada uma abordagem baseada em PCR quantitativo. Os transcritos de GmTIP1;9, GmTIP2;5 e GmTIP3;2 apresentaram alterações em resposta à presença da ureia na solução nutritiva, especialmente em raízes no primeiro dia de tratamento, indicando seu envolvimento no metabolismo de nitrogênio associado a ureia. Além disso, outras doze MIPs têm sua expressão aumentada nessas condições, tanto nas raízes quanto na parte aérea. Tais resultados, juntamente com a identificação de um homólogo de DUR3 no genoma da soja, sugerem a existência de um complexo sistema de transporte que permite que a planta capture e transporte o nitrogênio sob variadas concentrações de ureia no meio.

Ampliar o conhecimento acerca da estrutura, função e regulação das aquaporinas transportadoras de ureia em plantas irá permitir, além do aprofundamento de questões básicas relacionadas ao transporte e metabolismo de ureia em plantas, a elaboração de estratégias para utilização mais eficiente da ureia como fertilizante nitrogenado, diminuindo os custos para a produção agrícola e para o meio ambiente.

6. Referências Bibliográficas

- Alleva, K. *et al.*, 2010. Cloning, functional characterization, and co-expression studies of a novel aquaporin (FaPIP2;1) of strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany*, 61(14), pp.3935–3945.
- Aponte-Santamaría, C., Hub, J.S. e de Groot, B.L., 2010. Dynamics and energetics of solute permeation through the Plasmodium falciparum aquaglyceroporin. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 12(35), pp.10246–10254.
- Azad, K.A. *et al.*, 2012. Substitution of a single amino acid residue in the aromatic/arginine selectivity filter alters the transport profiles of tonoplast aquaporin homologs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818(1), pp.1–11.
- Becker-Ritt, A.B. *et al.*, 2007. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon*, 50(7), pp.971–983.
- Beitz, E. *et al.*, 2006. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), pp.269–274.
- Bienert, G.P. *et al.*, 2014. Maize plasma membrane aquaporin ZmPIP2;5, but not ZmPIP1;2, facilitates transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(1 Part B), pp.216–222.
- Borgnia, M.J. e Agre, P., 2001. Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), pp.2888–2893.
- Campo, R.J., Araujo, R.S. e Hungria, M., 2009. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. *Symbiosis*, 48(1-3), pp.154–163.
- Cao, F.-Q. *et al.*, 2010. Identification and Characterization of Proteins Involved in Rice Urea and Arginine Catabolism. *Plant Physiology*, 154(1), pp.98–108.
- Chaumont, F. e Tyerman, S.D., 2014. Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations. *Plant Physiology*, 164(4), pp.1600–1618.
- Choi, W.-G. e Roberts, D.M., 2007. Arabidopsis NIP2;1, a Major Intrinsic Protein Transporter of Lactic Acid Induced by Anoxic Stress. *The Journal of biological chemistry*, 282(33), pp.24209–24218.
- Chothia, C. e Lesk, A.M., 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *The EMBO Journal*, 5(4), pp.823–826.
- Dall’Agnol, A., Lazarotto, J.J. e Hiraçuri, M.H., 2010. Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira. *Circular Técnica Embrapa Soja*, 74, pp.1–20.

- Danielson, J.Å.H. e Johanson, U., 2008. Unexpected complexity of the Aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology*, 8, p.45.
- Dean, R.M. *et al.*, 1999. Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry*, 38(1), pp.347–353.
- Denker, B.M. *et al.*, 1988. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(30), pp.15634–15642.
- Deshmukh, R.K. *et al.*, 2013. Identification and functional characterization of silicon transporters in soybean using comparative genomics of major intrinsic proteins in *Arabidopsis* and rice. *Plant molecular biology*, 83(4-5), pp.303–315.
- Dixon, N.E. *et al.*, 1975. Letter: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *Journal of the American Chemical Society*, 97(14), pp.4131–4133.
- Dynowski, M. *et al.*, 2008. Molecular determinants of ammonia and urea conductance in plant aquaporin homologs. *FEBS letters*, 582(16), pp.2458–2462.
- Eckert, M. *et al.*, 1999. New aspects of plant aquaporin regulation and specificity. *Journal of Experimental Botany*, 50(339), pp.1541–1545.
- Eskew, D.L., Welch, R.M. e Cary, E.E., 1983. Nickel: An Essential Micronutrient for Legumes and Possibly All Higher Plants. *Science*, 222(4624), pp.621–623.
- Eswar, N. *et al.*, 2006. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. In *Current Protocols in Bioinformatics*. p. Unit–5.6.
- Fitzpatrick, K.L. e Reid, R.J., 2009. The involvement of aquaglyceroporins in transport of boron in barley roots. *Plant, Cell and Environment*, 32(10), pp.1357–1365.
- Follmer, C. *et al.*, 2004. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* urease: Biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry*, 271(7), pp.1357–1363.
- Forrest, K. e Bhave, M., 2007. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Functional e Integrative Genomics*, 7(4), pp.263–289.
- Fortin, M.G., Morrison, N.A. e Verma, D.P., 1987. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Research*, 15(2), pp.813–824.
- Frick, A. *et al.*, 2014. X-ray structure of human aquaporin 2 and its implications for nephrogenic diabetes insipidus and trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (17), pp.6305–6310.
- Froger, A. *et al.*, 1998. Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Science*, 7(6), pp.1458–1468.

- Fu, D. *et al.*, 2000. Structure of a Glycerol-Conducting Channel and the Basis for Its Selectivity. *Science*, 290(5491), pp.481–486.
- Galluci, E., Micelli, C. e Lippe, C., 1971. Non-electrolyte permeability across thin lipid membranes. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 79, pp.881–887.
- Gans, W., Herbst, F. e Merbach, W., 2006. Nitrogen balance in the system plant - Soil after urea fertilization combined with urease inhibitors. *Plant, Soil and Environment*, 52(Spec. Iss.), pp.36–38.
- Gaspar, M., 2011. Aquaporinas : de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. *Brazilian Journal of Botany*, 34(4), pp.481–491.
- Gaspar, M. *et al.*, 2003. Cloning and characterization of ZmPIP1-5b , an aquaporin transporting water and urea. *Plant Science*, 165, pp.21–31.
- Gattolin, S., Sorieul, M. e Frigerio, L., 2011. Mapping of Tonoplast Intrinsic Proteins in Maturing and Germinating Arabidopsis Seeds Reveals Dual Localization of Embryonic TIPs to the Tonoplast and Plasma Membrane. *Molecular Plant*, 4(1), pp.180–189.
- Gerbeau, P. *et al.*, 1999. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *The Plant Journal*, 18(6), pp.577–587.
- Gerendás, J. e Sattelmacher, B., 1997. Significance of N source (urea vs. NH₄NO₃) and Ni supply for growth, urease activity and nitrogen metabolism of zucchini (*Cucurbita pepo* convar. *giromontiina*). *Plant and Soil*, 196, pp.217–222.
- Gerendás, J., Zhu, Z. e Sattelmacher, B., 1998. Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 49(326), pp.1545–1554.
- Goldberg, T. *et al.*, 2014. LocTree3 prediction of localization. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), pp.W350–W355.
- Gomes, D. *et al.*, 2009. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(6), pp.1213–1228.
- Gonen, T. e Walz, T., 2006. The structure of aquaporins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 39(4), pp.361–396.
- Goodstein, D.M. *et al.*, 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), pp.D1178–D1186.
- De Groot, B.L. e Grubmüller, H., 2001. Water Permeation Across Biological Membranes : Mechanism and Dynamics of Aquaporin-1 and GlpF. *Science*, 294, pp.2353–2357.
- Gu, R. *et al.*, 2012. Isolation and characterization of three maize aquaporin genes, ZmNIP2;1, ZmNIP2;4 and ZmTIP4;4 involved in urea transport. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 45(2), pp.96–101.

- Gupta, A.B. e Sankararamakrishnan, R., 2009. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: Characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biology*, 9, p.134.
- Gutiérrez, R.A., 2012. Systems Biology for Enhanced Plant Nitrogen Nutrition. *Science*, 336(6089), pp.1673–1675.
- Hawkins, J. e Bóden, M., 2006. Detecting And Sorting Targeting Peptides With Neural Networks And Support Vector Machines. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 04(01), pp.1–18.
- Heinen, R. *et al.*, 2014. Expression and characterization of plasma membrane aquaporins in stomatal complexes of *Zea mays*. *Plant Molecular Biology*, 86(3), pp.335–350.
- Hirakuri, M.H., 2014. Avaliação econômica da produção de soja para a safra 2014/15. *Circular Técnica Embrapa Soja*, 107, pp.1–22.
- Hiroaki, Y. *et al.*, 2006. Implications of the Aquaporin-4 Structure on Array Formation and Cell Adhesion. *Journal of Molecular Biology*, 355(4), pp.628–639.
- Hoagland, D.R. e Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347(347), pp.1–32.
- Hohmann, S., 2002. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (2), pp.300–372.
- Holm, L. *et al.*, 2005. NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archives*, 450(6), pp.415–428.
- Hove, R. e Bhave, M., 2011. Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. *Plant Molecular Biology*, 75(4-5), pp.413–430.
- Hungria, M., Campo, R.J. e Mendes, I.C., 2001. Fixação Biológica do Nitrogênio na Cultura de Soja. *Circular Técnica Embrapa Soja*, 35, pp.1–48.
- Hungria, M. e Vargas, M.A.T., 2000. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65, pp.151–164.
- Hwang, J.H., Ellingson, S.R. e Roberts, D.M., 2010. Ammonia permeability of the soybean nodulin 26 channel. *FEBS letters*, 584(20), pp.4339–4343.
- Ikeda, M. *et al.*, 2011. The NPC motif of aquaporin-11, unlike the NPA motif of known aquaporins, is essential for full expression of molecular function. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), pp.3342–3350.
- Ishibashi, K., 2006. Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(8), pp.989–993.
- James, C., 2008. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. In *ISAAA Brief No.39*. New York.

- Johanson, U. *et al.*, 2001. The Complete Set of Genes Encoding Major Intrinsic Proteins in Arabidopsis Provides a Framework for a New Nomenclature for Major Intrinsic Proteins in Plants. *Plant Physiology*, 126(4), pp.1358–1369.
- Jung, J.S. *et al.*, 1994. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *Journal of Biological Chemistry*, 269(20), pp.14648–14654.
- Kaldenhoff, R. *et al.*, 2007. Characterization of Plant Aquaporins. *Methods in Enzymology*, 428(07), pp.505–531.
- Katsuhara, M. *et al.*, 2014. Functional and molecular characteristics of rice and barley NIP aquaporins transporting water, hydrogen peroxide and arsenite. *Plant Biotechnology*, 31(3), pp.213–219.
- Kearse, M. *et al.*, 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), pp.1647–1649.
- Kim, S. *et al.*, 2008. Overexpression of Gene Encoding Tonoplast Intrinsic Aquaporin Promotes Urea Transport in Arabidopsis. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 51(3), pp.102–110.
- Kinugasa, T. *et al.*, 2012. Demand and supply of N in seed production of soybean (*Glycine max*) at different N fertilization levels after flowering. *Journal of Plant Research*, 125(2), pp.275–281.
- Klebl, F., Wolf, M. e Sauer, N., 2003. A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (*Cucurbita pepo* L.), and by Arabidopsis thaliana δ -TIP or γ -TIP. *FEBS Letters*, 547(1–3), pp.69–74.
- Knepper, M.A. e Nielsen, S., 2004. Peter Agre, 2003 Nobel Prize Winner in Chemistry. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(4), pp.1093–1095.
- Kojima, S. *et al.*, 2007. AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *The Plant Journal*, 52(1), pp.30–40.
- Kojima, S., Bohner, A. e von Wirén, N., 2006. Molecular Mechanisms of Urea Transport in Plants. *The Journal of Membrane Biology*, 212(2), pp.83–91.
- Krogh, A. *et al.*, 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes1. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), pp.567–580.
- Kutman, B.Y., Kutman, U.B. e Cakmak, I., 2014. Effects of seed nickel reserves or externally supplied nickel on the growth, nitrogen metabolites and nitrogen use efficiency of urea- or nitrate-fed soybean. *Plant and Soil*, 376(1-2), pp.261–276.
- Lagrée, V. *et al.*, 1999. Switch from an Aquaporin to a Glycerol Channel by Two Amino Acids Substitution. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (11), pp.6817–6819.

- Larkin, M.A. *et al.*, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), pp.2947–2948.
- Laskowski, R. *et al.*, 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26, pp.283–291.
- Lee, J.K. *et al.*, 2005. Structural basis for conductance by the archaeal aquaporin AqpM at 1.68 Å. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), pp.18932–18937.
- Leitão, L. *et al.*, 2012. Grapevine aquaporins: gating of a tonoplast intrinsic protein (TIP2;1) by cytosolic pH. *PLoS ONE*, 7(3), p.e33219.
- Leitão, L. *et al.*, 2014. The grapevine tonoplast aquaporin TIP2;1 is a pressure gated water channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1), pp.289–294.
- Li, G., Santoni, V. e Maurel, C., 2014. Plant aquaporins: Roles in plant physiology. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840, pp.1574–1582.
- Liu, L.-H., Ludewig, U., Frommer, W.B., *et al.*, 2003. AtDUR3 Encodes a New Type of High-Affinity Urea/H⁺ Symporter in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(March), pp.790–800.
- Liu, L.-H., Ludewig, U., Gassert, B., *et al.*, 2003. Urea Transport by Nitrogen-Regulated Tonoplast Intrinsic Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(3), pp.1220–1228.
- Liu, Q. *et al.*, 2009. Divergence in function and expression of the NOD26-like intrinsic proteins in plants. *BMC Genomics*, 10(1), p.313.
- Livak, K.J. e Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), pp.402–408.
- Loque, D. *et al.*, 2005. Tonoplast Intrinsic Proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 Facilitate NH₃ Transport into the Vacuole. *Plant Physiology*, 137(2), pp.671–680.
- Ludewig, U. e Dynowski, M., 2009. Plant aquaporin selectivity: where transport assays, computer simulations and physiology meet. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(19), pp.3161–3175.
- Martí-Renom, M.A. *et al.*, 2000. Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29(1), pp.291–325.
- Mathai, J. e Zeidel, M., 2007. Measurement of Water and Solute Permeability by Stopped-Flow Fluorimetry. In A. Dopico, ed. *Methods in Membrane Lipids SE - 21*. Methods in Molecular Biology™. Humana Press, pp. 323–332.
- Maurel, C., 1997. Aquaporins and Water Permeability of Plant Membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), pp.399–429.
- Maurel, C. *et al.*, 2008. Plant Aquaporins : Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. *Annual Review of Plant Biology*, 59, pp.595–624.

- Maurel, C., 2007. Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letters*, 581, pp.2227–2236.
- Mérigout, P., Lelandais, M., *et al.*, 2008. Physiological and Transcriptomic Aspects of Urea Uptake and Assimilation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiology*, 147(3), pp.1225–1238.
- Mérigout, P., Gaudon, V., *et al.*, 2008. Urea Use Efficiency of Hydroponically Grown Maize and Wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 31(3), pp.427–443.
- Mitani, N., Yamaji, N. e Ma, J., 2008. Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, Lsi1. *Pflügers Archives*, 456(4), pp.679–686.
- Möller, S., Croning, M.D.R. e Apweiler, R., 2001. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, 17(7), pp.646–653.
- Nacry, P., Bouguyon, E. e Gojon, A., 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil*, 370(1-2), pp.1–29.
- Nehls, U. e Dietz, S., 2014. Fungal aquaporins: cellular functions and ecophysiological perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(21), pp.8835–8851.
- Newby, Z.E.R. *et al.*, 2008. Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite Plasmodium falciparum. *Nature Structural e Molecular Biology*, 15(6), pp.619–625.
- Nguyen, M., Moon, S. e Jung, K.-H., 2013. Genome-wide expression analysis of rice aquaporin genes and development of a functional gene network mediated by aquaporin expression in roots. *Planta*, 238(4), pp.669–681.
- Noronha, H. *et al.*, 2014. The grape aquaporin VvSIP1 transports water across the ER membrane. *Journal of Experimental Botany*, 65(4), pp.981–993.
- Otto, B. *et al.*, 2010. Aquaporin Tetramer Composition Modifies the Function of Tobacco Aquaporins. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(41), pp.31253–31260.
- Park, W. *et al.*, 2010. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biology*, 10(142), pp.1–17.
- Perez Di Giorgio, J. *et al.*, 2014. Prediction of Aquaporin Function by Integrating Evolutionary and Functional Analyses. *The Journal of Membrane Biology*, 247(2), pp.107–125.
- Petrov, V.D. e Van Breusegem, F., 2012. Hydrogen peroxide - a central hub for information flow in plant cells. *AoB plants*, 2012, p.pls014.
- Pettersson, N. *et al.*, 2006. Expression of heterologous aquaporins for functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 50, pp.247–255.
- Pierleoni, A. *et al.*, 2006. BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics*, 22 (14), pp.e408–e416.

- Pierleoni, A., Martelli, P.L. e Casadio, R., 2011. MemLoc: predicting subcellular localization of membrane proteins in Eukaryotes. *Bioinformatics*, 39(suppl_2), pp.W375–W380.
- Polacco, J.C., Mazzafera, P. e Tezotto, T., 2013. Opinion: nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. *Plant Science*, 199-200, pp.79–90.
- Polacco, J.C. e Winkler, R.G., 1984. Soybean Leaf Urease: A Seed Enzyme? *Plant Physiology*, 74(4), pp.800–803.
- Preston, G.M. *et al.*, 1992. Appearance os Water Channels in Xenopus Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein. *Science*, 256, pp.385–387.
- Qian, Z.-J. *et al.*, 2015. Differential responses of plasma membrane aquaporins in mediating water transport of cucumber seedlings under osmotic and salt stresses. *Plant, Cell e Environment*, 38(3), pp.461–473.
- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C. e Sasisekharan, V., 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7(1), pp.95–99.
- Real-Guerra, R., Carlini, C.R. e Stanisçuaski, F., 2013. Role of lysine and acidic amino acid residues on the insecticidal activity of Jackbean urease. *Toxicon*, 71(0), pp.76–83.
- Reid, R., 2014. Understanding the boron transport network in plants. *Plant and Soil*, 385(1-2), pp.1–13.
- Rentsch, D., Schmidt, S. e Tegeder, M., 2007. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters*, 581(12), pp.2281–2289.
- Reuscher, S. *et al.*, 2013. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Aquaporins in Tomato. *PLoS ONE*, 8(11), p.e79052.
- Roulin, A. *et al.*, 2013. The fate of duplicated genes in a polyploid plant genome. *The Plant Journal*, 73(1), pp.143–153.
- Sabir, F. *et al.*, 2014. Exploring three PIPs and three TIPs of grapevine for transport of water and atypical substrates through heterologous expression in aqy-null yeast. *PLoS ONE*, 9(8), p.e102087.
- Sakurai, J. *et al.*, 2005. Identification of 33 Rice Aquaporin Genes and Analysis of Their Expression and Function. *Plant and Cell Physiology*, 46(9), pp.1568–1577.
- Santos Filho, O.A. e Alencastro, R.B. de, 2003. Modelagem de Proteínas por Homologia. *Química Nova*, 26(2), pp.253–259.
- Savage, D.F. *et al.*, 2003. Architecture and Selectivity in Aquaporins: 2.5 Å X-Ray Structure of Aquaporin Z. *PLoS Biology*, 1(3), p.e72.
- Schmutz, J. *et al.*, 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463(7278), pp.178–183.

- Sehnal, D. *et al.*, 2013. MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels. *Journal of Cheminformatics*, 5(39), pp.1–13.
- Shelden, M.C. *et al.*, 2009. Identification and functional characterisation of aquaporins in the grapevine, *Vitis vinifera*. *Functional Plant Biology*, 36(12), pp.1065–1078.
- Sirko, A. e Brodzik, R., 2000. Plant ureases: Roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47(4), pp.1189–1195.
- Soares, J.R., Cantarella, H. e Menegale, M.L. de C., 2012. Ammonia volatilization losses from surface-applied urea with urease and nitrification inhibitors. *Soil Biology and Biochemistry*, 52(0), pp.82–89.
- Soto, G. *et al.*, 2008. AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed Arabidopsis pollen-specific aquaporins, transport water and urea. *FEBS Letters*, 582(29), pp.4077–4082.
- Soveral, G. *et al.*, 2006. Water channels are important for osmotic adjustments of yeast cells at low temperature. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 5), pp.1515–1521.
- Soveral, G. *et al.*, 2007. Water transport in intact yeast cells as assessed by fluorescence self-quenching. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), pp.2341–2343.
- Stebbins, N. *et al.*, 1991. Genetic Tests of the Roles of the Embryonic Ureases of Soybean. *Plant Physiology*, 97(3), pp.1004–1010.
- Sui, H. *et al.*, 2001. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, 414(6866), pp.872–878.
- Takano, J. *et al.*, 2006. The Arabidopsis Major Intrinsic Protein NIP5;1 Is Essential for Efficient Boron Uptake and Plant Development under Boron Limitation. *The Plant Cell*, 18(6), pp.1498–1509.
- Tanaka, M. *et al.*, 2008. NIP6;1 Is a Boric Acid Channel for Preferential Transport of Boron to Growing Shoot Tissues in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(10), pp.2860–2875.
- Tanaka, M. e Fujiwara, T., 2008. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflügers Archives*, 456(4), pp.671–677.
- Tao, P. *et al.*, 2014. Genome-wide identification and characterization of aquaporin genes (AQPs) in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), pp.1131–1145.
- Tegeger, M., 2014. Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: opportunities for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 65 (7), pp.1865–1878.
- Terpolilli, J.J., Hood, G.A. e Poole, P.S., 2012. Chapter 5 - What Determines the Efficiency of N₂-Fixing Rhizobium-Legume Symbioses? R. Physiology, ed. *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 325–389.

- Todd, C.D. e Polacco, J.C., 2004. Soybean cultivars “Williams 82” and “Maple Arrow” produce both urea and ammonia during ureide degradation. *Journal of Experimental Botany*, 55(398), pp.867–877.
- Torisky, R. *et al.*, 1994. A single gene (Eu4) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. *Molecular and General Genetics MGG*, 242(4), pp.404–414.
- Torisky, R.S. e Polacco, J.C., 1990. Soybean Roots Retain the Seed Urease Isozyme Synthesized during Embryo Development. *Plant Physiology*, 94(2), pp.681–689.
- Törnroth-Horsefield, S. *et al.*, 2006. Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439(9), pp.688–694.
- Uehlein, N. *et al.*, 2008. Function of *Nicotiana tabacum* Aquaporins as Chloroplast Gas Pores Challenges the Concept of Membrane CO₂ Permeability. *The Plant Cell*, 20(3), pp.648–657.
- Uehlein, N. *et al.*, 2012. The *Arabidopsis* aquaporin PIP1;2 rules cellular CO₂ uptake. *Plant, Cell e Environment*, 35(6), pp.1077–1083.
- Untergasser, A. *et al.*, 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), p.e115.
- Venkatesh, J., Yu, J.-W. e Park, S.W., 2013. Genome-wide analysis and expression profiling of the *Solanum tuberosum* aquaporins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73(0), pp.392–404.
- Verdoucq, L. *et al.*, 2014. Plant aquaporins on the move: reversible phosphorylation, lateral motion and cycling. *Current Opinion in Plant Biology*, 22(0), pp.101–107.
- Wallace, I.S., Choi, W.-G. e Roberts, D.M., 2006. The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(8), pp.1165–1175.
- Wallace, I.S. e Roberts, D.M., 2005. Distinct Transport Selectivity of Two Structural Subclasses of the Nodulin-like Intrinsic Protein Family of Plant Aquaglyceroporin Channels. *Biochemistry*, 44(51), pp.16826–16834.
- Wallace, I.S. e Roberts, D.M., 2004. Homology Modeling of Representative Subfamilies of *Arabidopsis* Major Intrinsic Proteins. Classification Based on the Aromatic/Arginine Selectivity Filter. *Plant Physiology*, 135(2), pp.1059–1068.
- Wang, W.-H. *et al.*, 2008. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science*, 175(4), pp.467–477.
- Wang, Y., Schulten, K. e Tajkhorshid, E., 2005. What Makes an Aquaporin a Glycerol Channel? A Comparative Study of AqpZ and GlpF. *Structure*, 13(8), pp.1107–1118.
- Wang, Y. e Tajkhorshid, E., 2010. Nitric oxide conduction by the brain aquaporin AQP4. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 78(3), pp.661–670.

- Wiebke-Strohm, B. *et al.*, 2012. Ubiquitous urease affects soybean susceptibility to fungi. *Plant Molecular Biology*, 79(1-2), pp.75–87.
- Wilson, M.R., O'Donogue, S.I. e Walker, N.A., 1988. The transport and metabolism of urea in *Chara australis* III: Two specific transport systems. *Journal of Experimental Botany*, 39, pp.763–774.
- Witte, C.-P. *et al.*, 2002. Leaf Urea Metabolism in Potato. Urease Activity Profile and Patterns of Recovery and Distribution of (15)N after Foliar Urea Application in Wild-Type and Urease-Antisense Transgenics. *Plant Physiology*, 128(3), pp.1129–1136.
- Witte, C.-P., 2011. Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180(3), pp.431–438.
- Wree, D. *et al.*, 2011. Requirement for asparagine in the aquaporin NPA sequence signature motifs for cation exclusion. *FEBS Journal*, 278(5), pp.740–748.
- Wu, B. e Beitz, E., 2007. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(18), pp.2413–2421.
- Wudick, M.M., Luu, D.-T. e Maurel, C., 2009. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist*, 184(2), pp.289–302.
- Yooyongwech, S. *et al.*, 2008. Changes in aquaporin gene expression and magnetic resonance imaging of water status in peach tree flower buds during dormancy. *Physiologia Plantarum*, 134(3), pp.522–533.
- Zahran, H.H., 1999. Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), pp.968–989.
- Zelazny, E. *et al.*, 2007. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30), pp.12359–12364.
- Zhang, D.Y. *et al.*, 2013. Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max* L.). *PLoS ONE*, 8(2), p.e56312.
- Zhao, D. *et al.*, 2007. Comparative transport efficiencies of urea analogues through urea transporter UT-B. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(7), pp.1815–1821.
- Zhou, L. *et al.*, 2014. Constitutive overexpression of soybean plasma membrane intrinsic protein GmPIP1;6 confers salt tolerance. *BMC Plant Biology*, 14(1), p.181.
- Zobiole, L.H.S. *et al.*, 2007. Efeito da compactação do solo e do sulfentrazone sobre a cultura da soja em duas condições de água no solo. *Planta Daninha*, 25(3), pp.537–545.
- Zobiole, L.H.S. *et al.*, 2010. Effect of glyphosate on symbiotic N₂ fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. *Applied Soil Ecology*, 44(2), pp.176–180.

7. Apêndices

Apêndice 1

Identidade entre as sequências de aquaporinas de soja e as sequências de GlpF, AQP1 bovina e SoPIP2;1. Os alinhamentos foram realizados com o ClustalW.

Aquaporina	GlpF	AQP1	SoPIP2;1
GmPIP1;1	22,20%	34,30%	64,80%
GmPIP1;3	21,90%	32,30%	66,30%
GmPIP1;4	21,60%	32,60%	66,30%
GmPIP1;5	22,10%	32,80%	67,80%
GmPIP1;6	21,90%	32,60%	67,30%
GmPIP1;7	23,40%	33,40%	64,40%
GmPIP1;8	23,40%	32,50%	65,10%
GmPIP2;1	24,40%	34,70%	85,10%
GmPIP2;2	23,60%	32,70%	83,00%
GmPIP2;3	24,70%	34,70%	76,70%
GmPIP2;4	24,70%	34,40%	76,70%
GmPIP2;5	24,00%	33,90%	76,10%
GmPIP2;6	23,40%	34,50%	74,70%
GmPIP2;7	23,20%	33,60%	73,20%
GmPIP2;8	23,30%	33,70%	74,50%
GmPIP2;9	23,50%	34,60%	75,00%
GmPIP2;10	23,80%	34,60%	74,30%
GmPIP2;11	23,50%	34,30%	74,70%
GmPIP2;12	23,80%	33,70%	75,00%
GmPIP2;13	22,80%	34,70%	74,40%
GmPIP2;14	23,00%	35,90%	77,20%
GmTIP1;1	22,50%	34,80%	33,50%
GmTIP1;2	22,50%	34,80%	32,70%
GmTIP1;3	21,80%	31,00%	31,50%
GmTIP1;4	21,70%	33,90%	34,00%
GmTIP1;5	22,80%	32,50%	32,30%
GmTIP1;6	22,40%	33,60%	33,50%
GmTIP1;7	22,40%	32,60%	32,70%
GmTIP1;8	23,10%	31,90%	31,70%
GmTIP1;9	21,90%	29,00%	33,10%
GmTIP2;1	25,00%	33,00%	33,50%
GmTIP2;2	24,20%	34,10%	34,20%
GmTIP2;3	22,30%	35,00%	35,90%
GmTIP2;4	22,30%	35,00%	36,30%
GmTIP2;5	22,90%	33,30%	35,90%
GmTIP2;6	22,90%	33,70%	37,30%
GmTIP2;7	22,20%	31,90%	34,90%

Apêndice 1 – continuação

Identidade entre as sequências de aquaporinas de soja e as sequências de GlpF, AQP1 bovina e SoPIP2;1. Os alinhamentos foram realizados com o ClustalW.

Aquaporina	GlpF	AQP1	SoPIP2;1
GmTIP3;1	22,80%	33,00%	32,30%
GmTIP3;2	22,10%	33,30%	31,90%
GmTIP3;3	25,50%	34,20%	34,20%
GmTIP3;4	24,80%	32,00%	33,50%
GmTIP4;1	23,50%	33,00%	29,40%
GmTIP4;2	23,90%	32,60%	29,80%
GmTIP5;1	21,00%	24,60%	26,30%
GmNIP1;1	26,10%	22,40%	26,80%
GmNIP1;2	26,00%	25,70%	26,40%
GmNIP1;3	27,50%	25,60%	26,60%
GmNIP1;4	26,10%	25,80%	26,10%
GmNIP1;5	25,20%	24,30%	26,00%
GmNIP2;1	23,60%	24,40%	23,80%
GmNIP2;2	23,40%	23,50%	23,00%
GmNIP4;1	27,80%	24,10%	25,70%
GmNIP4;2	28,50%	26,20%	26,00%
GmNIP5;1	21,70%	23,30%	23,90%
GmNIP6;1	21,40%	21,70%	23,50%
GmNIP6;2	23,60%	22,70%	24,90%
GmSIP1;1	20,90%	20,00%	22,30%
GmSIP1;2	19,20%	21,40%	22,50%
GmSIP1;3	20,10%	20,10%	19,80%
GmSIP1;4	19,40%	19,10%	19,80%
GmSIP1;5	18,90%	19,50%	20,40%
GmSIP1;6	19,20%	18,10%	21,10%
GmSIP2;1	17,00%	20,90%	16,60%
GmSIP2;2	18,50%	20,30%	19,10%
GmXIP1;1	14,10%	22,40%	23,50%
GmXIP1;2	18,50%	24,90%	24,30%

Apêndice 2

CURRICULUM VITAE resumido

MENEGASSI, A.

1) DADOS PESSOAIS

Nome: Angela Menegassi

Local e data de nascimento: Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, 03/12/1985

Endereço profissional: Avenida Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43431, sala 209. Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS. CEP 91501-970

Telefone profissional: (55) 51 33087600 **E-mail:** angelamenegassi@ufrgs.br

2) FORMAÇÃO

2008 – 2008 Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

2003 – 2007 Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

3) ESTÁGIOS

2014 – 2015 Doutorado Sanduíche – Laboratório de Transporte Biológico, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa (Portugal)

“Caracterização Funcional de Aquaporinas de Soja”

2006 – 2008 Bolsista de Iniciação Científica – Laboratório de Proteínas Tóxicas, Departamento de Biofísica, UFRGS (Brasil)

“Urease de *Gossypium hirsutum*: Purificação, Caracterização Cinética e Efeitos Biológicos”

2005 – 2006 Bolsista de Iniciação Científica – Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, UFRGS (Brasil)

“Estudo da Biologia Molecular e Celular de Plelmintos Parasitos (*Echinococcus granulosos* e *Mesocestoides corti*) e de Vida Livre (Planárias)”

4) PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2005 Destaque de Sessão - Monitoramento Ambiental
Salão de Iniciação Científica – UFRGS

5) EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

2008 – 2010 Colaborador
Bayer S/A HealthCare

6) ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

MENEGASSI, A., WASSERMAN, G. E., OLIVERA-SEVERO, D., BECKER-RITT, A. B., MARTINELLI, A. H. S., FEDER, V., CARLINI, C. R. Urease from Cotton (*Gossypium hirsutum*) Seeds: Isolation, Physicochemical Characterization, and Antifungal Properties of the Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.4399 - 4405, 2008.

BALDISSERA, R., BACH, E., LIMA, R. P., MENEGASSI, A., PIOVESAN, A. R., FONSECA, G. C. Distribution of Understorey Web Building Spiders Along an Interface Area of Araucaria Forest and Pinus Plantation in Southern Brazil. *Neotropical Biology and Conservation*, v.3, p.3 - 8, 2008.

7) RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

MENEGASSI, A., PRADO, M. J., BRAUN, R. L., ANDREIS, F. C., VERLI, H., CARLINI, C. R., STANISCUASKI, F. Expression Analysis and Structural and Functional Characterization of Soybean Aquaporins (*Glycine max*). In: IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas (SBGMP), 2013, Bento Gonçalves. Anais do IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2013.

MENEGASSI, A., PRADO, M. J., BRAUN, R. L., ANDREIS, F. C., VERLI, H., CARLINI, C. R., STANISCUASKI, F. Análise da Expressão e Caracterização Estrutural e Funcional de Aquaporinas de Soja (*Glycine max*) In: XIV Encontro Anual do Programa de

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012, Porto Alegre. Livro de resumos do XIV Encontro Anual do PPGBCM, 2012.

MENEGASSI, A., BRAUN, R. L., VERLI, H., CARLINI, C. R., STANISCUASKI, F. Análise da Expressão e Caracterização Estrutural e Funcional de Aquaporinas de Soja (*Glycine max*) In: XIII Encontro Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre. Livro de resumos do XIII Encontro Anual do PPGBCM, 2011.

MENEGASSI, A., OLIVERA-SEVERO, D., WASSERMAN, G. E. *Gossypium hirsutum* Urease: Purification, Kinetic Characterization and Biological Effects In: XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), 2008, Águas de Lindóia. XXXVII Reunião Anual da SBBq, 2008.

MENEGASSI, A., WASSERMAN, G. E., OLIVERA-SEVERO, D. Urease de *Gossypium hirsutum*: Purificação, Caracterização Cinética e Efeitos Biológicos In: XIX Salão de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre. XIX Salão de Iniciação Científica, 2007, p.348-349.

MENEGASSI, A., OLIVERA-SEVERO, D., WASSERMAN, G. E., CARLINI, C. R. Purificação parcial, caracterização cinética e efeitos biológicos da urease de *Gossypium hirsutum* In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre. XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, p.450-450.

MENEGASSI, A., OLIVERA-SEVERO, D., WASSERMAN, G. E., CARLINI, C. R. Purificação parcial, caracterização cinética e efeitos biológicos da urease de *Gossypium hirsutum*. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos do PPGBMC, 2006.

MENEGASSI, A., OLIVERA-SEVERO, D., WASSERMAN, G. E., CARLINI, C. R.

Urease(s) of *Gossypium hirsutum* seeds purification and kinetic characterization In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2006, Águas de Lindóia. XXXV Reunião Anual SBBq - Programa, 2006.

MENEGASSI, A., KNAKIEVICZ, Tanise, FERREIRA, Henrique Bunselmeyer. Avaliação da toxicidade do cobre baseada na análise de diferentes biomarcadores em planárias *Girardia tigrina* regenerantes. In: XVII Salão de Iniciação Científica, 2005, Porto Alegre. XVII Salão de Iniciação Científica, 2005, p.500-501.

KNAKIEVICZ, Tanise, MENEGASSI, A., FERREIRA, Henrique Bunselmeyer. Estudo Preliminar da Regeneração de Planárias *Girardia schubarti* e *Girardia tigrina* (Platyhelminthes, Tricladida). In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2005, Porto Alegre. Livro de Resumos do PPGBCM, 2005, p.41.