

MONTAGEM PARCIAL DO PSEUDOGENE DA L GULONO LACTONO OXIDASE RESPONSÁVEL PELA BIOSÍNTESE DA VITAMINA C EM HUMANOS

João Gabhriel Beserra Borges (1); Francisco Robson Figueiredo Da Costa (1); Luis Flávio Mendes Saraiva (2)

(1) Universidade Estadual do Ceará – UECE, gabhriel.borges@aluno.uece.br; (1) Universidade Estadual do Ceará - UECE, rob.figueiredo@aluno.uece.br; (2) Universidade Estadual do Ceará – UECE, flavio.saraiva@uece.br;

Introdução

O ácido L-ascórbico (AsA) ou vitamina C é um dos mais abundantes metabólitos, possuindo um importante papel na fisiologia das plantas em relação aos diferentes tipos de estresses, bem como, também está envolvido no crescimento e desenvolvimento desses organismos. Ele é um poderoso antioxidante, responsável principalmente pela diminuição dos níveis de radicais livres produzidos, tanto em situações normais como em momentos de injúrias. Sua ação antioxidante pode ser caracterizada como um mecanismo direto ou indireto.

Os processos redox que envolvem o ácido ascórbico são reversíveis, ocasionando a formação de radicais livres intermediários. A perda de um elétron leva à formação do radical L-ascorbato intermediário, também chamado ácido monodeidroascórbico ou ácido semideidroascórbico. A perda do segundo elétron leva à formação do ácido deidroascórbico. É importante observar que para a oxidação do ácido ascórbico no total dois prótons e dois elétrons são perdidos.

Como antioxidante, o ácido ascórbico possui um importante papel contra estresses oxidativos. As espécies reativas do oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), íon superóxido e radical hidroxil causam estresse oxidativo e são gerados por uma larga variedade de fatores. Inicialmente o peróxido de hidrogênio gerado pela explosão oxidativa desempenha um papel importante na iniciação da resposta de hipersensibilidade (CHEN, SILVA e KLESSIG 1993; LEVINE et al., 1994), entretanto, dada a elevada toxicidade das espécies reativas do oxigênio como o radical hidroxila esses níveis devem ser controlados.

Esse controle é realizado através de uma rede conectada de antioxidantes. Dentro dessa rede, o ácido ascórbico elimina as ROS através de múltiplos mecanismos. O próprio AsA tem a capacidade de eliminar diretamente diferentes ROS como o oxigênio singlete e os radicais superóxido e hidroxila (PADH, 1990).

Vários papéis são atribuídos ao ácido ascórbico, mas alguns se destacam como a fotoproteção, resposta a ferimentos, herbivoria de insetos, morte celular programada, respostas hormonais, florescimento, senescência e na expansão e divisão celular. Como algumas espécies de animais perderam a capacidade de síntese do ácido L-ascórbico (incluindo primatas), eles necessitam consumir em sua dieta fontes de vitamina C, tornando-se dependentes de organismos primários produtores como as plantas.

Pelo menos quatro rotas são cogitadas até o presente momento, sendo que duas são bem definidas, acabando por formar compostos que precedem a síntese do ascorbato. Nesse ponto se destacam inicialmente aquelas que envolvem a participação da L-galactose e GDP-L-gulose, do D-galacturonato, e do mio-inositol, considerados como intermediários propostos na biossíntese do ácido ascórbico, indicando que parte da via animal também pode estar operando em plantas. Cada uma dessas moléculas representa uma das rotas propostas para a biossíntese.

Nos humanos, aparentemente o gene da enzima L- gulono-1,4-lactona oxidase seria o responsável pela biossíntese, estando presente em outros mamíferos, mas diferentemente dos humanos o gene está ativo nesses animais. Mais recentemente, foi demonstrado que a expressão ectópica do gene da L- gulono-1,4-lactona oxidase de ratos recuperou o teor de ácido ascórbico em folhas em cinco Arabidopsis mutantes (VTC) que eram deficientes em teores de ácido ascórbico (RADZIO, 2003). Isto significou que ou a enzima L- gulono-1,4-lactona oxidase presente em ratos usa L-galactono-1,4-lactona como substrato, ou que o substrato real, L-gulono-1,4-lactona, está sendo produzido em Arabidopsis (VALPUESTA e BOTELLA, 2004).

Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi anotar uma sequencia parcial do pseudogene da L- gulono-1,4-lactona oxidase presente no genoma humano, utilizando ferramentas de bioinformática, possuindo pelo menos dois éxons do pseudogene, bem como verificar sua identidade com o gene bem definido da enzima mitocondrial l galactono lactono desidrogenase.

Metodologia

Quatro sequencias de mRNA da L- gulono-1,4-lactona oxidase de foram obtidos no NCBI, National Center of Biotechnology Institute, sendo alinhadas na ferramenta Clustaw juntamente com a sequencia genomica não anotada do NCBI do gene da L- gulono-1,4-lactona oxidase humana. Após submissão das quatro sequencias de CDs obtidas no NCBI, sequencias de *Rattus norvegicus*, *Sus scrofa*, *Mus musculus*, *Mustelus manazo* com a sequência genômica não anotada de *Homo sapiens* da L- gulono-1,4-lactona oxidase procedeu-se a identificação das zonas de identidade. Seguiu-se a montagem das regiões de identidade e identificação dos éxons e introns

Resultados e discussão

A espécie humana possui um pseudo gene da l gulono lactono oxidase, uma enzima ainda carente de isolamento e purificação responsável em outros mamíferos pela biossíntese da vitamina C. Comparativamente, a l galactono lactono desidrogenase, comumente confundida com a l gulono lactono oxidase, devido a sua capacidade de transformar cada uma seus carboidratos específicos em vitamina C é confundida em abordagens no NCBI. Geralmente, quando sequencias de l gulono lactono oxidase são buscadas o que é encontrado é um misto de l gulono lactono desidrogenase e l galactono lactono desidrogenase, dificultando o trabalho do pesquisador, já que em artigos científicos de referência a enzima citada em mamíferos é a l gulono lactono oxidase. Para uma real caracterização do gene e da sequência protéica, foi identificada uma região de 3114 pb de uma região cromossômica, constando de três éxons terminais. Tal região é mais extensa que as três regiões codantes anotadas, o que leva a crê que existam mais exons no restante do fragmento genômico. O último éxon possuía 129 pb precedido de um intron com 1835 pb. Anterior ao último íntron o penúltimo éxon possuía 165 pb. Finalmente, o penúltimo íntron foi precedido do antepenúltimo éxon detendo 148pb. A presença desses três éxons servem para gradualmente anotar o restante do pseudo gene, mas comparativamente ao gene da l galactono lactono desidrogenase, pode-se especular a presença de no mínimo quatro éxons. Diferentemente da l galactono lactono desidrogenase, a l gulono lactono oxidase é uma enzima solúvel. A l galactono lactono desidrogenase está presente na membrana mitocondrial interna, já a l gulono lactono oxidase é citoplasmática, portanto, ambas possuem dois substratos muito parecidos e exatamente o mesmo produto.

Conclusões

A definição do estudo “*in silico*”, por ferramentas de bioinformática do gene da L- gulono-1,4-lactona oxidase, permitiu a verificação de baixa conservação da identidade das espécies comparadas com as regiões de identidade ds *Homo sapiens*. As abo possibilitando assim futuras intervenções de terapia gênica ou outras técnicas genômicas abordagens laboratoriais com a expressão do gene em humanos, tomando como ponto de partido os estudos com outros mamíferos e abordagens “*in silico*”.

Palavras-Chave: *Vitamina C; L- gulono-1,4-lactona oxidase; Ascorbato.*

Referências

- CHEN Z, SILVA H.; KLESSIG, D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science** 262, 1883–1886, 1993.
- LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell** 79, 583–593, 1994.
- PADH, H. Cellular functions of ascorbic acid. **Biochemistry and Cell Biology** 68, 1166–1173,1990.
- RADZIO, J. A.; LORENCE A.; CHEVONE B.I.; NESSLER C.L. L-Gulono-1,4-lactone oxidase expression rescues vitamin C-deficient Arabidopsis vtc mutants. **Plant Molecular Biology** 53, 837–844, 2003.
- VALPUESTA, V.; BOTELLA, M.A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: New pathways for an old antioxidant. **Trends in Plant Science**. p.573-574, 2004.