UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Gabriel José De Carli

***“Panagrolaimus superbus* tolera troca total,
homogênea e instantânea de sua matriz de
H₂O por D₂O: estudos de sua aquaporina”**

RIBEIRÃO PRETO, SP
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Gabriel José De Carli

***“Panagrolaimus superbus tolera troca total,
homogênea e instantânea de sua matriz de
H₂O por D₂O: estudos de sua aquaporina”***

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

RIBEIRÃO PRETO, SP
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

De Carli, Gabriel José

Panagrolaimus superbus tolera troca total, homogênea e instantânea de sua matriz de H₂O por D₂O: estudos de sua aquaporina.

Gabriel José De Carli. Ribeirão Preto: USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

1. Anidrobiose. 2. Óxido de Deutério. 3. Aquaporina 4. *Panagrolaimus superbus*.

Apoio e suporte financeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular da Anidrobiose, localizado no Bloco 14 da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) – USP. Com apoio das seguintes instituições:

- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pelo espaço físico
 - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
 - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
-

Dedico esta dissertação aos meus pais Anastácio e Clair pelo apoio incondicional, tanto físico quanto emocional. Agradeço a todos que de alguma forma, direta e indiretamente, contribuíram para que eu concluísse essa etapa na minha vida.

OBRIGADO !!

Agradecimentos

Agradeço a todos que de me prestaram suporte durante a jornada do mestrado, direta ou indiretamente.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Tiago Campos Pereira pelos ensinamentos desde 2013. Por todas as oportunidades e por todas as portas abertas nesses 5 anos em que fui seu aluno. Obrigado pela paciência, e, principalmente, por me fazer exercitar a ciência, o pensamento científico e por ser o principal responsável por todas as minhas conquistas acadêmicas.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento durante o tempo em que estive no curso de mestrado.

Agradeço ao departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela contribuição profissional e pelos auxílios cedidos durante o mestrado. Em especial a secretária Susie.

Agradeço ao departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pela infraestrutura e espaço físico para realização das atividades relacionadas ao mestrado.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Genética Molecular da Anidrobiose, Tiago Alves Jorge de Souza e Danyel Fernandes Contiliani pelo apoio e pelas valorosas conversas e discussões sobre os mais variados assuntos, acadêmicos ou não. Agradeço a companhia e o ambiente gerado pela presença de vocês no dia a dia.

Agradeço aos amigos de longa data, Aline, Danilo, Igor, João Pedro, Laura, Rafael, Rodrigo e Vanessa pela força e pensamentos positivos. Pela presença nos momentos fáceis e difíceis, sérios e descontraídos. E pelo valoroso sentimento de amizade que recebo de vocês.

Agradeço as pessoas que moram comigo Ederson, Gabriel, Gustavo, Lucas, Rodrigo e Thiago por me aturarem durante os anos de 2017 e 2018.

Agradecimentos

Agradeço a minha namorada Laissa pela presença nos momentos fáceis e difíceis. Por todo carinho e amor que recebi durante o tempo que estamos juntos.

E agradeço aos meus pais e a minha família por, sistematicamente, permitirem que eu colocasse tijolo em cima de tijolo na construção da minha vida, em todos os aspectos. Se cheguei a algum lugar foi porque sempre obtive apoio incondicional de vocês.

*Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas.
Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura pra achar as que estão certas”*

(Carl Sagan)

RESUMO:***Panagrolaimus superbus* tolera troca total, homogênea e instantânea de sua matriz de H₂O por D₂O: estudos de sua aquaporina.**

O nematoide de vida livre *Panagrolaimus superbus* é uma espécie anidrobiótica, ou seja, possui a capacidade de sobreviver ao estresse hídrico extremo adentrando no estado de anidrobiose. Durante tal estado adquire tolerância a extremos de temperatura (~0 K a +151 °C), pressões hidrostáticas (1,2 GPa) e radiação ionizante. Entretanto, não se sabe qual a tolerância a água deuterada, molécula que possui dois átomos de deutério (isótopo estável e natural do hidrogênio) ao invés do hidrogênio, que em altas concentrações afeta negativamente sistemas biológicos. Além disso, uma vez que o processo de anidrobiose depende do movimento de moléculas de água pela membrana plasmática da célula, não se sabe se os canais responsáveis por este transporte, as aquaporinas, de espécies anidrobióticas possuem alguma particularidade na sua estrutura. Em vista disso, o objetivo deste trabalho visa investigar se em concentrações de 10%, 40% e 99,9% D₂O, tanto de modo crônico quanto agudo, *P. superbus* tem sua viabilidade, crescimento populacional e desenvolvimento alterados. Além disso, a comparação *in silico* da sequência de aminoácidos (estrutura primária) entre aquaporinas de espécies anidrobióticas e não anidrobióticas, com ênfase nas sequências genéticas de *P. superbus* foi feita. Os resultados encontrados demonstram a alta tolerância de *P. superbus* a concentrações relativamente elevadas de D₂O, não tendo sua viabilidade e desenvolvimento alterados em nenhum cenário, mesmo com uma troca total, homogênea e instantânea de sua matriz aquosa. Efeitos negativos foram encontrados apenas no crescimento populacional após exposição 10%, 40% e 99,9% D₂O, contudo não o inviabilizaram. Ademais, não foram encontradas grandes diferenças entre as sequências primárias de aquaporinas de anidrobiotos e não anidrobiotos, sugerindo que estes canais de água não divergem em estrutura terciária entre tais grupos. Dos dois ESTs encontrados em *P. superbus* (números de acesso no NCBI: GW411914.1 e GW408200.1) o primeiro deles é o provável representante do gene da aquaporina na espécie, enquanto que o segundo aparenta ser um transcrito não codificante de proteínas.

Palavras-chave: Anidrobiose, óxido de deutério, aquaporina, *Panagrolaimus superbus*

ABSTRACT:***Panagrolaimus superbis* tolerates the total, homogeneous and immediate exchange of its H₂O matrix to D₂O: studies on its aquaporin.**

The free-living nematode *Panagrolaimus superbis* is an anhydrobiotic species, it means that this species has the capacity to survive extreme water stress entering into the state of anhydrobiosis. During such a state, it acquires tolerance to extremes of temperature (~ 0 K to +151 °C), hydrostatic pressures (1.2 GPa) and ionizing radiation. However, the tolerance to deuterium oxide is poorly investigated. This molecule has two atoms of deuterium (natural and stable isotope of hydrogen) rather than hydrogen and in high concentrations negatively affects biological systems. Furthermore, since the process of anhydrobiosis depends on the movement of water molecules across the cell membrane, it is unclear whether the channels responsible for this transport, aquaporins, of anhydrobiotic species have some particularity in their structures. In view of this, the work aims to investigate whether *P. superbis* has its viability, population growth and development altered at concentrations of 10%, 40% and 99.9% D₂O in chronic and acute expositions. In addition, the *in silico* analyses of amino acid sequence (primary structure) of aquaporins between anhydrobiotic and non-anhydrobiotic species, with emphasis at the *P. superbis* genetic sequences, were performed. The results demonstrated the high tolerance of *P. superbis* at high concentrations of D₂O, their viability and development did not change in any scenario, even with a total, homogeneous and instantaneous exchange of their aqueous milieu. Negative effects were found only on population growth after exposure to 10%, 40% and 99.9% D₂O, although not hindering the procedure. Furthermore, no significant differences were found between the primary aquaporin sequences of anhydrobiotic and non-anhydrobiotic species, suggesting that these water channels do not differ in tertiary structure between such groups. Two ESTs found in *P. superbis*, (NCBI access numbers: GW411914.1 and GW408200.1): the first likely corresponds to the aquaporin gene in the species, while the second appears to be a non-coding transcript.

Keywords: Anhydrobiosis, deuterium oxide, aquaporin, *Panagrolaimus superbis*

Lista de Siglas, Símbolos, Acrônimos e Abreviaturas

~	Aproximadamente
ν_e	Elétron antineutrino
<	Menor que
©	(<i>copyright</i>): Direitos autorais
®	(<i>Registered trademark symbol</i>): Marca registrada
°C	grau celsius, unidade de temperatura
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
μN	Micronewton
^{12}C	Carbono (elemento)
^1D	Deutério (isótopo)
^1H	Hidrogênio (isótopo)
^1T	Trítio (isótopo)
^2H	Deutério (isótopo)
3'	Extremidade de um nucleotídeo com carbono 3 livre, sem ligação fosfodiéster
^3H	Trítio (isótopo)
^3He	Isótopo leve do elemento Hélio
^4He	Isótopo pesado do elemento Hélio
5'	Extremidade de um nucleotídeo com fosfato do carbono 5 não ligado a outro nucleotídeo
^7Li	Isótopo estável pesado do elemento Lítio
Å	Ångström, unidade de comprimento (10^{-10} metros)
A	Indivíduos adultos
A	Número de massa atômica

Lista de Siglas, Símbolos, Acrônimos e Abreviaturas

Abi-3: uma variante de *Arabidopsis thaliana* com uma mutação que a torna insensível ao hormônio vegetal ácido abscísico

Ala: Alanina, aminoácido

ANOVA: Análise de variância

Aqp: aquaporina (s)

AQP1: Aquaporina 1

aqp-2 / AQP-2: Aquaporina 2

aqp-2a / AQP-2^a: Aquaporina 2, isoforma a

ar/R: Motivo de proteínas da superfamília MIP caracterizados pela presença de resíduos aromáticos e uma arginina

Asn: Asparagina, aminoácido

ATP: Adenosina trifosfato

BIB (*Big Brain*): Proteína de membrana com função de transporte presente no sistema nervoso de *Drosophila melanogaster*

Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*): Ferramenta de pesquisa de alinhamento básico local

Cal: Caloria, unidade de energia

cDNA: DNA complementar

CDSAqp2Ce: Região codificadora da aquaporina 2 isoforma a de *Caenorhabditis elegans*

Ce2a: Aquaporina 2 isoforma a de *Caenorhabditis elegans*

Centipoise: 10⁻² poise, unidade de viscosidade dinâmica

CHIP28 (*Channel-forming integral protein 28 kDa*): Proteína integral formadora de canal com 28 kDa

CuSO₄: Sulfato de cobre II

D: Quark Down

D₂O: Óxido de deutério, água deuterada ou água pesada

DIE (*Deuterium Isotopic Effect*): Efeito isotópico do deutério

Dyn: Dina (unidade de força, = 10⁻⁵ Newton)

e value (*expected value*): valor esperado de uma ocorrência por acaso

e⁻: Elétron

E₀: Energia livre de Gibbs inicial

Lista de Siglas, Símbolos, Acrônimos e Abreviaturas

E_0^D : Energia livre de Gibbs inicial do deutério

E_0^H : Energia livre de Gibbs inicial do hidrogênio

EA: Engenharia anidrobiótica

epPCR (*error-prone Polymerase Chain Reaction*): Reação em cadeia da polimerase propensa a erros

EST (*expressed sequence tag*): etiqueta de sequência expressa

et al. (Latim): e colaboradores

EtBr: Brometo de Etídio

FPKM (*Fragments Per Kilobase Million*): Fragmentos a cada 100 nucleotídeos por milhão

g/g: Proporção massa por massa (em gramas)

g: Aceleração da gravidade (9,8 metros por segundo ao quadrado)

g: Grama (unidade de massa)

GFP (*Green Fluorescent Protein*): proteína verde fluorescente

GLP (*Glycerol facilitator*): facilitador de glicerol, uma proteína transportadora de glicerol da membrana plasmática

GPa: Giga Pascal, 10^9 Pascal (unidade de pressão hidrostática)

GPD-3 / GPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h : Constante de Planck

h: hora

H₂O: Água

HTO: Água semi-tritiada, água semi-superpesada

ICRP: Comissão Internacional de Proteção Radiológica

IVT (*in vitro transcription*): Transcrição *in vitro*.

J: Joule, unidade de energia

K: Potássio (elemento)

kDa (kilodalton): 10^3 Daltons, unidade de massa atômica

KIE (*Kinect Isotopic Effect*): Efeito isotópico cinético

L1: Larvas no 1º estágio de desenvolvimento

L2: Larvas no 2º estágio de desenvolvimento

L4: Larvas no 4º estágio de desenvolvimento

Lista de Siglas, Símbolos, Acrônimos e Abreviaturas

LB (*luria broth*): Meio de cultivo para bactérias

LEA (*Late Embryogenesis Abundant*): Proteína abundante no final da embriogênese de sementes

m/v: Proporção massa/volume

M: Molar

M9: Tampão (isosmótico para *P. superbis*)

mfe (*minimum free energy*): energia livre mínima

MIP (*major intrinsic protein*): Principal proteína intrínseca

MIP26 (*major intrinsic protein 26kDa*): Principal proteína intrínseca de 26kDa

miRNA: micro RNA

mL: Mililitro

mol: grandeza de quantidade de substância ($=6,022 \times 10^{23}$)

mRNA: RNA mensageiro

n: Nêutron

N: Nitrogênio

Na: Sódio (elemento)

NaClO: Hipoclorito de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): Centro nacional para informações de biotecnologia

NGM (*Nematode Growth Medium*): Meio de cultura para nematoides

NOD: nodulina-26, uma proteína intrínseca de membrana de plantas

NPA: Tripeptídeo asparagina-prolina-alanina, motivo presente em proteínas da superfamília MIP

NPC: Tripeptídeo asparagina-prolina-cisteína, motivo presente em proteínas da superfamília MIP

NTP: Nucleosídeos trifosfatados

O: Oxigênio

OBT (*Organically Bound Tritium*): Compostos orgânicos com trítio ligado

OP50: Linhagem de bactéria da espécie *Escherichia coli*

p: Próton

p: Valor-p ou Nível descritivo (estatística)

Lista de Siglas, Símbolos, Acrônimos e Abreviaturas

Pa: Pascal, unidade de pressão (=1 Newton/metro ao quadrado)

Pb: Par(es) de base(s)

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reação em cadeia da DNA polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

ppm: Partes por milhão

pri-miRNA: microRNA primário

Pro: Prolina, aminoácido

Ps+3: EST GW411914.1 na fase de leitura +3

Ps-1: EST GW408200.1 na fase de leitura -1

Ps-2: EST GW408200.1 na fase de leitura -2

PsEDT: forma editada da tradução do EST GW408200.1

Psuperbus+3: EST GW411914.1 de *Panagrolaimus superbus*

Psuperbus-1-2 / PsuperbusPG: EST GW408200.1 de *Panagrolaimus superbus*

px: pixel

RBE (*Relative Biological Effectiveness*): Eficácia biológica relativa

RISC (*RNA-induced silencing complex*): Complexo de silenciamento induzido por RNA

RNAi: interferência por RNA

RNAmAqp2Ce: RNA mensageiro da aquaporina 2 de *Caenorhabditis elegans*

RPKM (*Reads Per Kilobase Million*): Leituras a cada 100 nucleotídeos por milhão

RT-qPCR (*Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction*): Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia e quantitativa da DNA polimerase.

S: segundo (unidade de tempo).

SIE (*Solvent Isotopic Effect*): Efeito isotópico de solvente

t: tempo

T: Timina

T₂O: Água tritiada, água superpesada

TIP (*tonoplast intrinsic protein*): Proteína intrínseca do tonoplasto, proteína de membrana com função de transporte no tonoplasto de células vegetais

™ (*trademark*): Marca registrada

u: Massa atômica

Lista de Siglas, Símbolos, Acrônimos e Abreviaturas

u	Quark Up
U	Unidade de atividade enzimática
v/v	Proporção volume por volume
ν	Frequência dos átomos envolvidos na ligação
V	Volt
W^-	Bóson
Z	número atômico = número de prótons no núcleo atômico
^1H	Hidrogênio (isótopo)

Lista de Figuras

Figura 1. Representantes de espécies anidrobióticas são observados em todos os reinos.....	03
Figura 2. Nematóide <i>Panagrolaimus superbus</i> , modelo deste trabalho.....	05
Figura 3. Níveis de hidratação e a anidrobiose.....	06
Figura 4. Armazenamento de vacinas à seco.....	09
Figura 5. Isótopos do elemento Hidrogênio.....	11
Figura 6. Diferenças entre valores de energia livre de Gibbs (E_0) entre reagentes hidrogenados (E_0^H) e deuterados (E_0^D)	14
Figura 7. Média do tempo de sobrevivência de camundongos em função da concentração de D_2O diluído na água fornecida	18
Figura 8. Topologia proposta para CHIP28	21
Figura 9. Modelo da ampulheta e tetrâmero de aquaporina	21
Figura 10. Esquema do transporte de água através da aquaporina CHIP28	23
Figura 11. Filogenia de aquaporinas	25
Figura 12. Placa de 12 poços utilizada nos experimentos de manutenção de curto prazo	35
Figura 13. Placa tripartida utilizada nos experimentos de imersão e reidratação a 99,9% D_2O	36
Figura 14. Edição da tradução do EST GW408200.1 de <i>P. superbus</i>	40
Figura 15. Procura por potenciais miRNAs reguladores de aquaporina de <i>P. superbus</i>	43
Figura 16. Exposição a 10% e 40% D_2O de maneira crônica por até 15 dias	45
Figura 17. Exposição de longo prazo de <i>P. superbus</i> em meios com 10%, 40% e 99,9% D_2O	46
Figura 18. Micrografias representativas das placas de cultivo do experimento de manutenção a longo prazo após 14 e 28 dias	47
Figura 19. Porcentagem de viabilidade de <i>P. superbus</i> dessecados e reidratados a 99,9% D_2O por 24h que passaram por etapas de centrifugação	48

Lista de Figuras

Figura 20. Resultados de vermes que foram imersos a 99,9% D ₂ O por 24h	49
Figura 21. Crescimento populacional de vermes, sincronizados, dessecados cujas etapas de reidratação foram a 99,9% D ₂ O.....	50
Figura 22. Alinhamentos dois a dois entre todas as sequências de proteínas geradas com os ESTs de <i>P. superbus</i> e com aquaporina 2 isoforma a de <i>C. elegans</i>	52
Figura 23. tBlastn® da aquaporina 2 isoforma a de <i>C. elegans</i> com o EST GSW408200.1 de <i>P. superbus</i>	53
Figura 24. Alinhamento múltiplo de aquaporinas de anidrobiontes	54
Figura 25. Alinhamento múltiplo de aquaporinas de não anidrobiontes	56
Figura 26. Alinhamento múltiplo de aquaporinas de anidrobiontes e não anidrobiontes	57
Figura 27. Estrutura secundária dos ESTs de <i>P. superbus</i>	60
Figura 28. Híbridações do cel-mir-50-5p	61
Figura 29. Híbridações do cel-mir-234-5p	62
Figura 30. Híbridações do cel-mir-234-3p	63
Figura 31. Híbridações do cel-mir-786-5p	64
Figura 32. Híbridações do cel-mir-8203-3p	65
Figura 33. Valores de abundância relativa de aquaporinas de <i>H. sapiens</i> , <i>C. elegans</i> e <i>P. superbus</i>	66
Figura 34. Comparação de crescimento populacional em meios deuterado e não deuterado	71
Figura 35. Biossíntese canônica de microRNAs.....	81
Figura 36. Ciclo de vida do nematoide <i>Caenorhabditis elegans</i>	83
Apêndice A. Decaimento β^-	88
Apêndice B. Micrografia da coloração de vermes após a reidratação para cálculo da viabilidade.....	89
Apêndice C. Micrografia da determinação das etapas do ciclo de vida	90
Apêndice E. Alinhamentos múltiplos entre proteínas dos ESTs de <i>P. superbus</i> com a aquaporina 2 isoforma a de <i>C. elegans</i>	92

Lista de Figuras

Apêndice F. Estruturas tridimensionais da aquaporina 2 isoforma a de <i>C. elegans</i> e da aquaporina 3, isoforma 1 da espécie humana	93
Apêndice G.1. Híbridações cel-mi-50-5p.....	94
Apêndice G.2. Híbridações cel-mir-234-5p	95
Apêndice G.3. Híbridações cel-mir-234-3p	96
Apêndice G.4. Híbridações cel-mir-786-5p	97
Apêndice G.5. Híbridações cel-mir-8203-3p	98
Apêndice H.1. Alinhamento entre o EST GW411914.1 e a região codificadora da aquaporina 2 de <i>C. elegans</i>	99
Apêndice H.2. Alinhamento entre o EST GW408200.1 e a região codificadora da aquaporina 2 de <i>C. elegans</i>	100
Apêndice H.3. Alinhamento entre o EST GW411914.1 e o EST GW408200.1	101
Apêndice I. Abundância de ESTs de actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, proteína ribossomal S2 da subunidade 40S e dos ESTs GW411914.1 e GW408200.1 de <i>P. superbis</i> em RPKM	102
Apêndice J. Abundância dos transcritos de actina, aquaporina 2, proteína ribossomal S2 da subunidade 40S e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase para cada fase do ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	103
Apêndice K. Abundância dos transcritos de actina, aquaporina 3, proteína ribossomal S2 e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em diferentes tecido de <i>Homo sapiens</i>	104

Lista de Tabelas

Tabela 1. Propriedades físicas da H ₂ O e D ₂ O.....	12
Tabela 2. Determinação das etapas do ciclo de vida de <i>P. superbis</i> com base na espessura mediana corporal	33
Tabela 3. Espécie, número de acesso e identidade das sequências listadas nessa seção	39
Tabela 4. Diferenças nas aquaporinas de não anidrobiontes em posições totalmente conservadas em aquaporinas de anidrobiontes	58
Tabela 5. Perda de propriedades bioquímicas semelhantes nas aquaporinas de não anidrobiontes em relação a aquaporinas de anidrobiontes	59
APÊNDICE D. Número de acesso de sequências biológicas utilizadas	91

Sumário

1. Introdução.....	01
1.1 Anidrobiose.....	02
1.2 Óxido de Deutério.....	10
1.3 Aquaporinas.....	19
2. Hipóteses.....	26
2.1 Hipóteses do Trabalho.....	27
3. Objetivos.....	28
3.1 Objetivos Gerais.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4. Materiais e Métodos	30
4.1 Manutenção de <i>P. superbus</i>	31
4.1.1 Manutenção de laboratório.....	31
4.1.2 Meios e soluções deuterados.....	31
4.2 Obtenção de população homogênea (sincronizada) de <i>P. superbus</i>	31
4.3 Ensaio de dessecação.....	32
4.4 Determinação de viabilidade.....	32
4.5 Determinação das fases do ciclo de vida.....	32
4.6 Determinação do crescimento populacional.....	33
4.7 Experimentos de exposição crônica a D ₂ O.....	34
4.7.1 Manutenção a curto prazo.....	34
4.7.2 Manutenção de laboratório.....	34
4.8 Experimentos de exposição aguda a 99,9% D ₂ O.....	35
4.8.1 Imersão em 99,9% D ₂ O.....	35
4.8.2 Ensaio de dessecação após imersão em 99,9% D ₂ O.....	36
4.8.3 Reidratação em 99,9% D ₂ O.....	37
4.9 Análise estatística.....	37
4.10 Análise <i>in silico</i> de aquaporina de <i>P. superbus</i>	38
4.10.1 Identificação de ESTs homólogos de aquaporina em <i>P. superbus</i>	38
4.10.2 Alinhamentos de proteínas.....	40
4.10.2.1 Alinhamento de ESTs de <i>P. superbus</i> com AQP2a de <i>C. elegans</i>	40
4.10.2.2 Alinhamento de aquaporinas de espécies anidrobióticas.....	41
4.10.2.3 Alinhamento de aquaporinas de espécies não anidrobióticas.....	41
4.10.2.4 Alinhamento de aquaporinas de espécies anidrobióticas e não anidrobióticas.....	41
4.10.3 Precursor de microRNAs.....	42
4.10.4 Regulação por microRNAs.....	42
4.10.5 Abundância relativa dos ESTs.....	43

5. Resultados.....	44
5.1 Exposição a óxido de deutério.....	45
5.1.1 Exposição crônica de curto prazo.....	45
5.1.2 Exposição crônica de longo prazo.....	46
5.1.3 Exposição aguda a 99,9% D ₂ O.....	48
5.2 Análise de aquaporinas.....	51
5.2.1 Alinhamento de ESTs de <i>P. superbus</i> com AQP2a de <i>C. elegans</i>	51
5.2.2 Alinhamento de aquaporinas de anidrobiontes.....	53
5.2.3 Alinhamento de aquaporinas de não anidrobiontes.....	55
5.2.4 Alinhamento de aquaporinas de anidrobiontes e não anidrobiontes.....	57
5.2.5 Precursor de miRNAs.....	60
5.2.6 Regulação por miRNAs.....	61
5.2.7 Abundância relativa dos ESTs.....	66
6. Discussão.....	67
6.1 Exposição a óxido de deutério.....	68
6.1.1 Viabilidade.....	69
6.1.2 Crescimento populacional.....	70
6.1.3 Desenvolvimento.....	73
6.1.4 Tolerância a D ₂ O.....	74
6.2 Aquaporinas.....	76
6.2.1 Proteínas codificadas pelos ESTs de <i>P. superbus</i>	76
6.2.2 Aquaporinas de anidrobiontes e não anidrobiontes.....	77
6.2.3 ESTs de <i>P. superbus</i>	79
7. Conclusões.....	85
8. Apêndices.....	87
8.1 Apêndice A.....	88
8.2 Apêndice B.....	89
8.3 Apêndice C.....	90
8.4 Apêndice D.....	91
8.5 Apêndice E.....	92
8.6 Apêndice F.....	93
8.7 Apêndice G.....	94
8.7.1 Apêndice G.1.....	94
8.7.2 Apêndice G.2.....	95
8.7.3 Apêndice G.3.....	96
8.7.4 Apêndice G.4.....	97
8.7.5 Apêndice G.5.....	98
8.8 Apêndice H.....	99
8.8.1 Apêndice H.1.....	99
8.8.2 Apêndice H.2.....	100
8.8.3 Apêndice H.3.....	101
8.9 Apêndice I.....	102
8.10 Apêndice J.....	103
8.11 Apêndice K.....	104

<i>Glossário.....</i>	<i>106</i>
<i>Referências bibliográficas.....</i>	<i>108</i>

1. Introdução

1.1 Anidrobiose

Em 1702, o microbiologista holandês Antony van Leeuwenhoek descrevia pela primeira vez, em uma carta, um fenômeno extraordinário que posteriormente seria conhecido como **anidrobiose** (do grego: “vida sem água”) (revisto em TUNNACLIFFE e LAPINSKI, 2003). Van Leeuwenhoek estava analisando amostras secas de calhas, que inicialmente não apresentavam sinais de vida, em um microscópio desenvolvido por ele mesmo. Após adicionar água em tais amostras ele observou o surgimento de pequenos organismos que chamou de ‘animálculos’ (revisto em TUNNACLIFFE e LAPINSKI, 2003). A descrição feita por van Leeuwenhoek se assemelha muito ao rotífero bdeloide *Philodina roseola* (figura 1D) (FORD, 1981).

Em 1884, o francês Alfred Giard propôs o termo derivado do grego anidrobiose para descrever o estado, sem sinais aparentes de vida, que um organismo adentra por meio da dessecação extrema (GIARD, 1884). O termo já bem fixado na literatura, entretanto, pode ser considerado tecnicamente incorreto, uma vez que o organismo em anidrobiose não é considerado vivo, além de ainda possuir uma quantidade mínima de água remanescente, insuficiente para manutenção de taxas metabólicas (TUNNACLIFFE e LAPINSKI, 2003).

O britânico David Keilin considera a anidrobiose uma forma particular de **criptobiose** (do grego: “vida escondida”). Termo proposto e definido por Keilin como sendo um estado de *vida latente*, no qual um organismo não possui taxa metabólica, ou esta não é detectável para mostrar sinais de vida; portanto, seu metabolismo é considerado paralisado ou não pode ser mensurado. Keilin ainda subdividiu a criptobiose em categorias, de acordo com a causa que a induz: *criobiose* (desencadeado por baixas temperaturas); *osmobiose* (alta osmolaridade); *termobiose* (altas temperaturas); *anoxibiose* (ausência de oxigênio) e *anidrobiose* (dessecação extrema), está última sendo o foco deste trabalho (KEILIN, 1959).

Nesse contexto, James Clegg propôs que a criptobiose representa um terceiro estado de organização biológica (vivo, morto e o *criptobiótico*), caracterizado pela *total suspensão da atividade metabólica de maneira reversível* (CLEGG, 2001).

Estudos realizados desde a descrição de van Leeuwenhoek evidenciaram a existência de espécies capazes de entrar em anidrobiose em todos os cinco reinos dos seres vivos: (i) *Monera* - a bactéria *Deinococcus radiodurans* (figura 1A) (MATTIMORE e BATTISTA, 1996), (ii) *Protista* - o ciliado *Colpoda inflata* (figura 1B) (MÜLLER et

al, 2010), (iii) *Fungi* - a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (figura 1C) (SCHEBOR et al., 2000), (iv) *Animalia* - o rotífero *Philodina roseola* (figura 1D) (FORD, 1981) e (v) *Plantae* - a planta da ressurreição *Selaginella lepidophylla* (figura 1E) (OLIVER et al., 2000).

Figura 1. Representantes de espécies anidrobióticas são observados em todos os reinos. (A) A bactéria *Deinococcus radiodurans* (Monera), (B) o ciliado *Colpoda inflata* (Protista), (C) a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fungi), (D) o rotífero bdeloide *Philodina roseola* (Animalia) e (E) a planta da ressurreição *Selaginella lepidophylla* (Plantae) (Imagens retiradas da internet).

Ademais, as espécies anidrobióticas podem ser divididas em duas categorias de acordo com a fase do desenvolvimento capaz de sobreviver a dessecação extrema (JÖNSSON, 2005).

Os anidrobiontes **estágio-específicos** são capazes de entrar em anidrobiose apenas em um determinado momento de seu desenvolvimento (geralmente uma fase larval ou de propágulo) como esporos de alguns fungos e bactérias (SUSSMAN e HALVORSON, 1966), sementes e grãos de pólen de plantas (VEGIS, 1964) até animais como a larva do díptera *Polypedilum vanderplanki* (HINTON, 1960) e o cisto do embrião do crustáceo *Artemia salina* (CLEGG, 1967). Já os **holo-anidrobiontes** possuem a capacidade de sobreviver a dessecação extrema em qualquer fase do seu ciclo de vida. Tal grupo é representado, principalmente, por tardígrados (MARCUS, 1929; RAMAZZOTTI, 1962), nematoides (VAN GUNDY, 1965; COOPER e VAN GUNDY, 1971) e rotíferos (SCHMIDT, 1948, CROWE, 1971).

Existe ainda outra subdivisão possível, de acordo com a velocidade com que o organismo adentra em anidrobiose: os estrategistas rápidos e lentos (WOMERSLEY, 1987). Os estrategistas lentos como o rotífera bdeloide *Philodina roseola* não são capazes de entrar em anidrobiose de imediato, necessitando de uma etapa de condicionamento, com redução gradual na umidade relativa, permitindo assim a expressão dos genes da via da anidrobiose (CLEGG, 2001). De modo inverso, os estrategistas rápidos, como o nematoide de vida livre *Panagrolaimus superbus*, modelo deste trabalho (figura 2), possuem a capacidade de entrar em anidrobiose de maneira imediata, possivelmente possuindo pré-adaptações em nível celular e expressando constitutivamente os genes relacionados a anidrobiose (WOMERSLEY, 1987; REARDON et al., 2010).

Notavelmente, o organismo em seu estado seco, isto é, em anidrobiose, adquire tolerância a diversos fatores físicos considerados extremos. Há relatos de organismos dessecados expostos a temperaturas de ~0 Kelvin (BECQUEREL, 1950), +151°C (RAHM, 1923), pressões hidrostáticas de 1,2 GPa (HORIKAWA et al., 2009), elevadas doses de radiação ultravioleta e gama (MOSELEY e EVANS, 1983) preservando a viabilidade após a reidratação. Adicionalmente, o tempo no qual o organismo pode permanecer no estado seco (em condições não extremas) excede o seu tempo de vida regular, relatos de sementes de lótus viáveis após cerca de 1000 anos foram feitos (SHEN et al., 1995), assim como bactérias halotolerantes de mais de 200 milhões de anos (VREELAND et al., 2000). Mas também há registros científicos mais bem documentados

da preservação de rotíferos, nematoides e tardígrados por períodos da ordem de décadas (STEINER e ALBIN, 1946).

Figura 2. Nematóide *Panagrolaimus superbus*, espécie modelo deste trabalho. Pertencente ao filo *Nematoda*, classe *Panagrolaimidae* e ordem *Rhabdita* (DE LEY e BLAXTER, 2002) esta espécie é de vida livre, com aproximadamente 1 mm de comprimento, se alimenta de bactérias (bacterióvoro) e habitante desde solos profundos, com maior proteção, até a superfície, onde há maior exposição ao sol. Sendo tais ambientes sujeitos a grandes variações de umidade, ele possui a capacidade adaptativa de entrar em anidrobiose em momentos de grande estresse hídrico (SHANNON et al., 2005).

A relevância da molécula de água (H_2O) para a existência da vida da maneira que se conhece é frequentemente subestimada em textos acadêmicos por ser tal conhecimento, muitas vezes, considerado óbvio (CHAPLIN, 2001). Sua estrutura, formando um dipolo, permite a solubilização de grande parte dos compostos presentes na célula, como proteínas, ácidos nucleicos e membranas biológicas. Essa solubilização ainda permite que tais compostos (proteínas, ácidos nucleicos e membranas) assumam conformações tridimensionais e, conseqüentemente, desempenhem uma função biológica (CHAPLIN, 2001). Diante disso, a existência de espécies capazes de se manter viáveis por decênios com uma quantidade de água próxima a zero é uma característica surpreendente e única na biologia (STEINER e ALBIN, 1946; GUIDETTI e JÖNSSON, 2002).

O processo de dessecação no qual o organismo adentra em animação suspensa por meio da perda progressiva de água é subdividido em três fases. A **desidratação**; a **dessecação** e o **estado seco** (figura 3).

Figura 3. Níveis de hidratação e a Anidrobiose. (A) Condição normal de hidratação em uma célula, os pontos azuis representam moléculas de H_2O . (B) Fase de desidratação. As biomoléculas intracelulares ainda permanecem totalmente hidratadas e ocorre a ativação das vias bioquímicas que levarão à anidrobiose; os pontos negros representam ‘solutos compatíveis’. (C) A anidrobiose propriamente dita. Os ‘solutos compatíveis’ substituem as moléculas de água e atuam como estabilizadores termodinâmicos, impedindo danos estruturais e o metabolismo.

A primeira fase - **desidratação** - (figura 2B) é caracterizada pela perda progressiva de água, contudo ainda há uma concha de hidratação nas macromoléculas celulares. A perda progressiva de água causa, na célula, alterações no pH, na viscosidade da matriz celular e na concentração de solutos. Estas modificações no ambiente intracelular são potencialmente desestabilizadoras de proteínas, membranas e ácidos nucleicos, uma vez que interferem nas forças intermoleculares desses compostos (ligações de Hidrogênio e forças de van der Waals) (CROWE, 1971; STRYER, 1999). As vias bioquímicas celulares, apesar de ainda funcionais, começam a se tornar menos eficientes (CLEGG, 1978; WOMERSLEY e SMITH, 1981). Nesta fase, considerada metabolicamente ativa, a célula anidrobionte interpreta a perda de água como um sinal-chave e ativa as adaptações necessárias para entrar em animação suspensa.

A **dessecação** corresponde à segunda fase, que é alcançada quando o conteúdo de água intracelular atinge proporções inferiores a 0,3 g/g de massa seca; ao se atingir proporções de 0,1 g/g de massa seca é hipotetizado que o metabolismo cessa (SAKURAI et al., 2008). Em tal condição, as macromoléculas celulares não estão completamente hidratadas, o que causaria danos estruturais. Entretanto a célula acumulou compostos polihidroxilados denominados ‘solutos compatíveis’, representados majoritariamente por proteínas hidrofílicas LEA (*late embryogenesis abundant*), primeiramente descritas nas fases finais do desenvolvimento de sementes, e dissacarídeos não-redutores como trealose (em animais) e sacarose (em plantas) (revisto em TUNNACLIFFE e LAPINSKI, 2003).

O acúmulo de ‘solutos compatíveis’ levou a **hipótese da substituição de água e vitrificação** (do inglês *water replacement hypothesis and vitrification*) (CLEGG et al., 1982; BURKE, 1986; SUN e LEOPOLD, 1997; CROWE et al., 1998). Os ‘solutos

compatíveis' são altamente solúveis e não reativos, possibilitando o acúmulo em altas concentrações sem prejuízo à célula. A presença em altas quantidades de dissacarídeos não-redutores contrabalanceia a osmolaridade extracelular durante as duas primeiras fases (desidratação e dessecação). Particularmente na fase de **dessecação**, tanto os dissacarídeos quanto as proteínas LEA atuam substituindo as moléculas de água, realizando interações intermoleculares do tipo ligação de Hidrogênio e estabilizando termodinamicamente a matriz celular (CLEGG, 1974, 1986; CROWE et al., 1992, 1998; SUN e LEOPOLD, 1997).

A terceira fase - **o estado seco** - representa o estado anidrobiótico propriamente dito (figura 3C). Neste estado a matriz celular, geralmente aquosa, é substituída por outra matriz sólida e amorfa (vítrea) pelo processo denominado vitrificação (SUN e LEOPOLD, 1997; CROWE et al., 1998; SAKURAI et al., 2008). A matriz vítrea formada principalmente pelos 'solutos compatíveis' agiria como estabilizador cinético, aumentando a viscosidade intracelular. Dessa forma, os componentes celulares estariam paralisados no tempo e no espaço, não havendo, portanto, qualquer difusão celular ou reação bioquímica, caracterizando a **animação suspensa** (revisto em TUNNACLIFFE e LAPINSKI, 2003).

Apesar dos dissacarídeos não-redutores e proteínas LEA desempenharem papéis cruciais no processo de anidrobiose (KEILIN, 1959; CROWE, 1971; WOMERSLEY, 1981; WOMERSLEY e SMITH, 1981; CROWE et al., 1992, 1998; SUN e LEOPOLD, 1998; CLEGG, 2001, SAKURAI et al., 2008), a simples presença desses compostos em elevadas concentrações intracelulares não parece garantir a viabilidade após a dessecação extrema. Isto pode ser comprovado em ao menos três diferentes experimentos descritos a seguir.

Estudos com a planta modelo não-anidrobiótica *Arabidopsis thaliana* insensível a ácido abscísico (mutantes *Abi-3*) demonstrou que ela acumula sacarose entre outros mono-oligossacarídeos em suas sementes. Ainda que a sacarose esteja presente em altas concentrações nas sementes, estas não foram capazes de entrar em anidrobiose (OOMS et al., 1993). Resultados semelhantes foram obtidos em células de ratos geneticamente modificadas, visando a síntese e acúmulo de grandes quantidades de trealose intracelular. Apesar da tolerância a desidratação ter sido aumentada, elas não foram capazes de sobreviver a dessecação extrema (GARCIA DE CASTRO e TUNNACLIFFE, 2000). Por fim, se evidenciou que alguns rotíferos anidrobióticos não acumulam dissacarídeos não-redutores (LAPINSKI e TUNNACLIFFE, 2003).

Em especial, este último dado sugere ainda que não há um processo único e comum para todas as espécies anidrobiontes, mostrando ser este um fenômeno complexo e plural. Outras vias celulares potencialmente envolvidas com a anidrobiose são proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*), sistema de reparo de DNA, sistema antioxidante, entre outros (revisto em TUNNACLIFFE e LAPINSKI, 2003; REARDON et al., 2010; TYSON et al., 2012).

O estudo e a compreensão da anidrobiose, assim como seus processos bioquímicos e fisiológicos é de especial interesse da **engenharia anidrobiótica** (EA). A EA visa aumentar a tolerância de estruturas biológicas sensíveis a desidratação, desde células e tecidos até estruturas macroscópicas como órgãos e organismos inteiros (GARCIA DE CASTRO et al., 2000).

Na área médica, por exemplo, futuras técnicas baseadas na anidrobiose poderiam ser empreendidas no armazenamento e manutenção de bancos de células, sangue, transporte e armazenamento de órgãos, e até vacinas. Esta última já demonstrada recentemente (figura 4) (ALCOCK et al., 2017). Adicionalmente, na área agrícola, linhagens de plantas expressando genes da via da anidrobiose poderiam sofrer menos perdas em épocas de estiagem, impactando positivamente áreas como produção alimentícia no campo e a estocagem de frutos a seco em armazéns (FRANÇA et al., 2007; FARRANT e MOORE, 2011).

Por fim, um trabalho publicado na revista *Science* em 2010 revelou uma curiosa faceta da anidrobiose: sua natureza terapêutica (WILSON e SHERMAN, 2010). Esta propriedade foi demonstrada em populações do rotífero anidrobionte *Habrotrocha elusa* artificialmente infectado pelo fungo parasita intracelular não-anidrobionte *Rotiferophthora angustipora*. Notavelmente, o rotífero se curou da infecção simplesmente permanecendo dessecado pelo período de quatro semanas (WILSON e SHERMAN, 2010). Assim sendo, um evento não invasivo foi capaz de evitar o colapso daquela população, que de outra forma seria exterminada pela infecção.

Figura 4. Armazenamento de vacinas a seco. (A) Micrografia eletrônica de varredura de uma matriz vítrea dentro da qual amostras virais foram preservadas. (B) Aparato utilizado para a inoculação da vacina. A membrana (A) contendo a vacina conservada a seco é posicionada entre os suportes (B₁ e B₂) e encaixada na seringa (C). Ao se apertar o êmbolo, a membrana contendo a matriz vítrea é reidratada, dissolvendo a vacina que segue o fluxo até a agulha para administração (retirado de ALCOCK et al., 2017).

1.2 Óxido de Deutério, água deuterada ou água pesada

O óxido de Deutério, água deuterada ou água pesada é um composto químico descrito na década de 1930 por Urey, Brickwedde e Murphy (1932). Sua composição é de um átomo de oxigênio e dois átomos de Deutério (^2H ou ${}_1\text{D}$) (figura 5B), um isótopo natural e estável do Hidrogênio (^1H ou ${}_1\text{H}$) (figura 5A). A concentração natural deste composto na natureza é de 150 ppm ou 0,015% (KATZ, 1960; KUSHNER, BAKER e DUNSTALL, 1999; MINAMOTO, WADA e SHIMIZU, 2011; KIRKINA et al., 2013).

Um terceiro isótopo de número atômico igual a um é o Trítio (^3H ou ${}_1\text{T}$) (figura 5C). Contudo, diferentemente do Hidrogênio e do Deutério, o Trítio é radioativo e por meio de um evento denominado decaimento β^- (beta negativo) (ver apêndice A) decai para o átomo de Hélio-3 (^3He), isótopo natural e estável do Hélio-4 (^4He), mais comum e abundante (KAUFMAN e LIBBY, 1954).

A origem do Trítio na natureza se dá por dois principais processos. A primeira é a fissão do átomo de nitrogênio em grandes altitudes por raios cósmicos, gerando átomos de Trítio que são rapidamente oxidados a T_2O (*óxido de Trítio, água tritiada ou água superpesada*) ou HTO (*água semi-superpesada*) e podem precipitar na forma de chuva ou neve. A segunda forma possível é por meio de Lítio (^7Li) em rochas ígneas. A fissão espontânea de átomos de urânio libera nêutrons que por sua vez reagem com pequenas quantidades ou traços de lítio, que decaem em Trítio (KAUFMAN e LIBBY, 1954).

Como dito anteriormente, o átomo de Trítio apresenta radioatividade e decai para o elemento Hélio (com tempo de meia vida de 12,5 anos) (KAUFMAN e LIBBY, 1954). Portanto a ingestão em grandes quantidades de T_2O ou HTO, ou ainda de compostos orgânicos ligados a Trítio (OBT ou *Organically Bound Tritium*) podem levar a problemas de saúde desde que atinjam uma eficácia biológica relativa (*“relative biological effectiveness”*) ou RBE (HARRISON, 2009). Coeficientes de RBE podem ser calculados com métodos de biocinética e dosimétricos. Assim sendo, a Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP) disponibilizou vários RBEs para humanos de diferentes idades, desde ingestão fetal até adulta (HARRISON, 2009).

Figura 5. Isótopos de elemento Hidrogênio. (A) Átomo de Hidrogênio. (B) Átomo de Deutério. (C) Átomo de Trítio. Perceba o número de nêutrons (círculo vermelho) presentes no núcleo atômico diferenciando os três isótopos. O átomo Hidrogênio não possui nêutrons. O átomo de Deutério possui um nêutron. O átomo de Trítio possui dois nêutrons (Imagem retirada da internet).

Uma vez que o deutério é um isótopo estável (não radioativo), água deuterada (D_2O) não foi avaliada pela ICRP. Entretanto, isto não significa que D_2O possua as mesmas características físicas que a molécula de H_2O (água comum) (KATZ, 1960), como pode ser observado na tabela 1.

Observa-se que grande parte das propriedades físicas listadas na tabela 1 se mostram diferentes entre os dois compostos (com exceção da tensão superficial). Particularmente, os valores de densidade a $20^\circ C$ e temperatura de densidade máxima sugerem que a mesma quantidade de matéria (massa) de D_2O e H_2O ocupam um espaço (volume) diferente à mesma temperatura. A interpretação para tal diferença é de que as ligações (pontes) de Hidrogênio, isto é, a interação entre um átomo de Hidrogênio de uma molécula com o átomo de Oxigênio de outra molécula de H_2O , são mais longas se comparadas as ligações (pontes) de Deutério (KATZ, 1960). Ao se olhar para as propriedades relacionadas a mudança do estado físico, pontos de congelamento e ebulição e calor de fusão e vaporização, temos que D_2O apresenta sempre valores superiores a H_2O . A sugestão é de que as ligações (pontes) mais curtas de Deutério também precisam de maior quantidade de energia para se reorganizar com a mudança de estado físico. Então, além mais curtas, as ligações de Deutério são consideradas também mais estáveis (fortes), de maior intensidade do que as ligações de Hidrogênio (KATZ, 1960).

Tabela 1. Propriedades físicas da H₂O e D₂O (adaptado de Katz, 1960).

Propriedades	H ₂ O	D ₂ O
Ponto de Congelamento (°C)	0	3.82
Ponto de Ebulição (°C)	100.0	101,72
Densidade (20°C, g/mL)	0.9982	1.1056
Temp. de Densidade Máxima (°C)	4.0	11.6
Viscosidade (20°C, centipoise)	1.005	1.25
Tensão Superficial (25°C, dyn.cm)	71.97	71.93
Calor de Fusão (cal/mol)	1436	1515
Calor de Vaporização (cal/mol)	10 515	10 864

Nota: Superfície de Tensão entre D₂O e H₂O são essencialmente idênticas. 1 poise = 0.1 Pa.s; 1 dyn = 10 µN; 1 cal = 4.1858 J.

Além dos contrastes físicos, a literatura lista duas diferenças químicas entre H₂O e D₂O: o efeito isotópico de solvente (SIE ou '*solvent isotopic effect*') e o efeito isotópico do deutério (DIE ou '*deuterium isotopic effect*') (KATZ, 1960; KUSHNER, BAKER e DUNSTALL, 1999; HIRAI et al., 2010).

O **SIE** (efeito de solvente) ocorre devido às propriedades inerentes do D₂O, isto é, quando o D₂O substitui o H₂O como solvente de uma solução (KATZ, 1960). As propriedades já discutidas anteriormente (densidade e temperaturas de fusão, vaporização, etc) aliados à maior viscosidade de D₂O podem modificar o modo como um soluto interage com o solvente. Por exemplo, a solubilidades de sais e gases em D₂O é menor que em H₂O na mesma temperatura. Isto ocorre porque as ligações (pontes) de Deutério são mais curtas e, conseqüentemente, o espaço entre as moléculas de D₂O, acomodando assim uma menor quantidade de sais e gases em solução (KATZ, 1960).

Entretanto, o maior efeito abordado do SIE, e também o de maior interesse biológico, é o aumento da estabilidade de macromoléculas em solução de D₂O. A maior estabilidade entre as ligações (pontes) de Deutério faz com que modificações tridimensionais de proteínas, membranas e ácidos nucleicos sejam desfavorecidas, produzindo um efeito estabilizador nessas macromoléculas. Outro fator corroborante para o aumento da rigidez tridimensional é que centros apolares (hidrofóbicos) ficam mais fortemente coesos (KUSHNER, BAKER e DUNSTALL, 1999; FARVER et al., 2001;

CHELGREEN e CREAMER, 2004; GORYUNOV, 2006; KANG, HOKE e CRANE, 2006; HOHLEFELDER et al., 2013).

O **DIE** (isotópico) se caracteriza quando o deutério substitui o hidrogênio em biomoléculas (KUSHNER, BAKER e DUNSTALL, 1999; CLELAND, 2004; KANG, HOKE e CRANE, 2006; HIRAI et al., 2010; HOHLEFELDER et al., 2013). A força de ligação do deutério com elementos como o Carbono, Nitrogênio e Oxigênio é mais forte do que a ligação do hidrogênio (KATZ, 1960; KUSHNER, BAKER e DUNSTALL, 1999). Por exemplo, a ligação C-D é considerada 10 vezes mais forte do que a C-H, já as ligações O-D e N-D são rapidamente convertidas em O-H e N-H, sendo difícil produzirem algum efeito biológico, de modo que apenas a ligação C-D é considerada para o DIE (KATZ, 1960; KUSHNER, BAKER e DUNSTALL, 1999).

A diferença na força de ligação causa uma alteração na reatividade da biomolécula. Quando a reação depende da quebra da ligação C-D, observa-se o efeito ‘primário’ do DIE. Já o efeito secundário do DIE é evidenciado quando C-D altera a taxa de quebra de outra ligação C-H. O efeito primário é considerado de maior relevância que o secundário (KUSHNER, BAKER e DUNSTALL, 1999).

A explicação para a diferença da força de ligação e, consequentemente, de reatividade, é o ‘nível de energia do ponto zero’. Essa propriedade física é dependente da frequência de vibração das ligações entre átomos no zero absoluto (0 K). Tal vibração por sua vez é calculada por $\frac{1}{2} h\nu$. Sendo ‘ h ’ a constante de Planck e ‘ ν ’ a frequência de vibração dos átomos envolvidos na ligação. A diferença está nesta frequência e existe devido a diferença de massa entre o deutério e o hidrogênio. Por mais que em termos absolutos a diferença nas massas seja considerada pequena (massa do deutério igual a 2u e massa do hidrogênio igual a 1u), em termos proporcionais o deutério possui o dobro da massa do hidrogênio. Assim, a frequência de vibração do deutério é menor que a do hidrogênio e, portanto, a energia do ponto zero de ligações com o deutério (C-D) é menor que a de ligações envolvendo o hidrogênio (C-H) (KATZ, 1960).

Com uma menor energia do ponto zero, ligações envolvendo o átomo de deutério necessitam de maior quantidade de energia para ser quebrada em comparação com ligações envolvendo o átomo de hidrogênio (figura 6) (KATZ, 1960).

Figura 6. Diferença entre os valores de energia livre de Gibbs (E_0) entre reagentes hidrogenados (E_0^H) e deuterados (E_0^D). Observa-se que a energia livre de Gibbs dos reagentes deuterados é menor que a de reagentes hidrogenados, necessitando de mais energia para alcançar o complexo ativado (extraído de Katz, 1960).

Geralmente, não é possível isolar os efeitos de SIE e DIE separadamente em sistemas biológicos. Por exemplo, um microrganismo crescendo em meio com D_2O (efeito SIE) ocasionalmente terá alguns átomos de deutério substituindo os de hidrogênio em biomoléculas (efeito de DIE) (KUSHNER, BAKER e DUNSTALL, 1999). Com o objetivo de estudar a interferência do deutério em sistemas biológicos foi proposto o efeito cinético do isótopo (KIE ou ‘kinect isotopic effect’). O **KIE** expressa a diferença na reatividade de reagentes deuterados. É calculado por meio da relação entre as constantes de reação quando os reagentes estão não deuterados (isótopo leve, hidrogênio) e quando os reagentes estão deuterados (isótopo pesado, deutério) (KATZ, 1960).

Desde a descrição do D_2O no começo do século XX estudos com o objetivo de avaliar possíveis impactos em seres vivos foram conduzidos (KATZ, 1960; THOMSON, 1960; KATZ et al, 1962; HUGHES, HILDRETH e BECKER, 1964; SAMIS, BAIRD e MASSIE, 1973; HIRAI et al., 2010; MINAMOTO, WADA e SHIMIZU, 2012; HAMMEL et al., 2013; HOHLEFELDER et al., 2013; KIRKINA et al., 2014).

Os primeiros organismos a serem estudados foram bactérias e algas unicelulares. Experimentos demonstraram que espécies de bactérias, como a *Escherichia coli* e algas como *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* conseguem se proliferar em meios de

cultura com concentrações 99,9% de D₂O (KATZ, 1960). Entretanto, tais proliferações demandam, segundo os autores, um tempo de adaptação ao meio deuterado, representado por uma fase *lag* do crescimento mais longa. Ademais tal adaptação também é variável, sendo de alguns dias para *C. vulgaris* e até meses para *S. obliquus* (KATZ, 1960). A proliferação, ainda, não chega a mesma magnitude, isto é, a densidade máxima alcançada no meio de cultura é menor se comparada a meios não deuterados (KATZ, 1960).

Outras espécies de bactérias submetidas a crescimento em meios 75% e 99,9% deuterados foram a bactéria aeróbica *Pseudomonas aeruginosa* e a anaeróbica facultativa *Streptococcus mutans* (HIRAI et al., 2010). *S. mutans* teve o crescimento inibido em ambas concentrações, tanto mensurando-se por turbidez quanto por células viáveis (via resazurina redutase). Por sua vez, *P. aeruginosa* mostrou resultados semelhantes aos anteriores, uma inibição inicial, fase *lag* mais longa, até um período de 48h e, surpreendentemente, depois de 72h, a densidade máxima da população foi alcançada e se mostrou semelhante ao controle sem D₂O (HIRAI et al., 2010).

Além de bactérias e algas unicelulares, fungos como *Torulopsis utilis* (levedura), *Aspergillus niger* e *Penicillium notatum* (ascomicetos) também foram investigados e mostraram crescimento semelhante ao encontrado na bactéria *E. coli* (KATZ, 1960). Particularmente no caso da levedura, o crescimento só foi possível após a adição de fatores nutricionais, como extratos de algas (também deuteradas) (KATZ, 1960).

Estudos com modelos animais, como *Drosophila melanogaster* investigaram não apenas a viabilidade em altas concentrações, mas também efeitos na fecundidade. Em concentrações de 50% no preparo do meio de cultura, a sobrevivência aproximada do modelo foi de no mínimo 10 dias a 10°C e de no máximo 30 dias a 25°C, enquanto que com o meio de cultura sem D₂O a sobrevivência foi de ~110 dias e 50 dias, nas respectivas temperaturas (SAMIS, BAIRD e MASSIE, 1973).

Hughes, Hildreth e Becker (1964) submeteram três casais adultos de *D. melanogaster* a concentrações de 0% a 100% (com intervalos de 10%), os casais em concentrações de 70% e acima não sobreviveram ao período de três dias. Os casais em concentrações 40% e 50% apesar de sobreviverem não foram capazes de colocar ovos, evidenciando uma queda de fecundidade, também observada nos casais a 30% na qual apenas a geração seguinte foi viável. Por fim, nas concentrações de 20% ou menos, foi observado um aumento da esterilidade dos casais.

Mais recentemente, também em *D. melanogaster* foram observados resultados semelhantes aos anteriores em concentração de 22,5%. Adicionalmente à redução da

viabilidade e da fecundidade, verificou-se que em D₂O os indivíduos demoraram mais tempo para atingir a fase adulta e, surpreendentemente, um aumento no tempo de vida (HAMMEL et al., 2013).

Os estudos em ratos (THOMSON, 1960) e camundongos (KATZ et al., 1962) revelaram que a troca da matriz aquosa não é homogênea nem total. Isto é, os autores observaram que a concentração atingida pelos modelos não se igualava à concentração administrada (troca não total); adicionalmente diferentes tecidos do modelo atingiam concentrações distintas (troca heterogênea).

O trabalho de Katz et al. (1962) ainda observou que os diversos tecidos atingem saturações distintas de D₂O, sendo o fígado um dos tecidos que atingem maior concentração e o cérebro um dos que atingem menor concentração. Outra característica observada por Katz et al. (1962) foi a de que o tempo de meia vida do deutério em diferentes tecidos também difere, sendo que tecidos que absorvem mais rapidamente o deutério (fígado) também o perdem mais facilmente e vice-versa. Por fim, foi gerada uma curva de sobrevivência dos camundongos em função da concentração administrada na água do bebedouro dos animais (figura 7).

Thomson (1960) encontrou uma hiperplasia de 50% no fígado e 60% nas glândulas adrenais, aumento da concentração de ureia sanguínea e alterações na manutenção da homeostase glicêmica. Até uma hora após a injeções de glicose, o animal deuterado não foi capaz de diminuir a concentração sanguínea, contudo após cinco horas a concentração em tais animais ficou abaixo da esperada (THOMSON, 1960).

Interessantemente, concentrações de D₂O abaixo da natural (0,015% ou 150 ppm) também produzem alterações em sistemas biológicos (KIRKINA et al., 2014). Com água derretida de neve, que possui menor concentração de D₂O, a atividade da Na-K ATPase diminuiu em 12% em concentrações de 30 ppm em relação ao controle de 145 ppm. A mobilidade de espermatozoides de bois (congelados) e humanos (frescos) também foi diminuta em concentrações de 30 e 60 ppm, respectivamente (KIRKINA et al., 2014).

Efeitos causados por D₂O em processos enzimáticos relevantes para biologia pode ser ilustrado pelos experimentos de Minamoto e colaboradores (2012). Os autores verificaram que concentrações elevadas (99,9%) de D₂O aumentam a taxa de erro da DNA polimerase em reações de PCR, possibilitando o desenvolvimento de protocolos de epPCR (*error-prone polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase propensa a erro). Protocolos de epPCR, normalmente, envolvem a adição de EtBr (brometo de etídio), alteração na concentração de sais ou desbalanço na concentração dos

desoxirribonucleosídeos trifosfatos. Em concentrações de 99,9% de D₂O foi verificado um aumento na taxa de erro de até oito vezes em situações sem Mn²⁺ (MINAMOTO, WADA e SHIMIZU, 2010). A explicação proposta pelos autores foi de que a atuação do SIE causaria alterações na estabilidade da polimerase afetando sua interação com os substratos (MINAMOTO, WADA e SHIMIZU, 2010).

Além da duplicação do DNA, também já foi investigada alterações na expressão gênica (HOHLEFELDER et al., 2013). Com um sistema *cell-free* de *E. coli*, Hohlefelder et al. analisaram a expressão de GFP em níveis de transcrição, tradução e maturação (fluorescência) em concentrações de 0% a 60% (com intervalos de 20%). Em concentrações de 40% e 60% os autores verificaram um aumento na síntese de mRNA de mais de 100%. Contudo o nível traducional em tais concentrações diminuiu em pelo menos metade nas concentrações de 40% e 60% D₂O. Por fim, a maturação, isto é, a aquisição da forma ativa da proteína, medida por meio da fluorescência, indicou apenas um tempo maior para a geração da fluorescência e não que a proteína fosse incapaz de enovelar corretamente (HOHLEFELDER et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa também avaliou os efeitos de D₂O em reações bioquímicas e na sobrevivência do modelo de estudo deste trabalho, *Panagrolaimus superbus* (DE CARLI, 2015). Em reações de duplicação de DNA (PCR) a eficiência da reação, medida por densitometria no gel de eletroforese, caiu cerca de 60% em concentrações de 45% e 60% de D₂O. O mesmo perfil de resultado foi encontrado para a eficiência de reações de transcrição *in vitro* (IVT), com reduções de 80% para concentrações de 45% e 60% de D₂O. Contudo, a eficiência de reações com a enzima DNase I não foi reduzida em concentrações de 15%, 30%, 45% e 60% (DE CARLI, 2015).

O nematoide anidrobiótico *P. superbus* não teve sua viabilidade alterada logo após permanecer exposto a concentrações de 75% e 99,9% D₂O por 24 horas. Sua viabilidade também não foi alterada quando os indivíduos foram dessecados (entraram em anidrobiose) e reidratados nas mesmas concentrações citadas acima (DE CARLI, 2015).

Figura 7. Média do tempo de sobrevivência de camundongos em função da concentração de D_2O diluído na água fornecida. O eixo horizontal se refere à concentração de D_2O fornecido, e no eixo vertical o tempo de sobrevivência médio em dias. Nota-se uma queda exponencial da longevidade com o aumento linear da dose de D_2O (Adaptado de Katz *et al.* 1962).

1.3 Aquaporinas

A molécula de água (H_2O) é um componente central para vida, fato este evidenciado pela essencialidade da homeostase hídrica intra- e pericelular (AGRE et al., 1993; KUWAHARA et al., 1998; CAMPBELL et al., 2008; BROWN, 2017). A passagem de moléculas de água para dentro ou para fora da célula ocorre em diversos processos, desde a digestão até controle de temperatura (AGRE et al., 1993; KORTENOEVEN e FENTON, 2014).

Moléculas de água são capazes de atravessar a membrana plasmática celular, entretanto de maneira muito lenta devido à natureza da bicamada lipídica (AGRE et al., 1993; CAMPBELL et al., 2008; BROWN, 2017). Contudo alguns processos celulares, como a filtração sanguínea nos rins dos vertebrados, dependem de uma mobilidade rápida e em grandes quantidades de água através da membrana, o que não seria possível apenas com o movimento de difusão (CAMPBELL et al., 2008; KORTENOEVE e FENTON, 2014; BROWN, 2017).

O termo ‘aquaporina’ foi proposto em 1993 por três grupos de pesquisa conjuntamente para descrever proteínas integrais de membrana que facilitam o rápido movimento de moléculas de água entre os meios intra- e extracelular de maneira seletiva (AGRE, SASAKI e CHRISPEELS, 1993).

A primeira aquaporina descrita foi a CHIP28 (*channel-forming integral protein 28 kDa*) em eritrócitos e células do tubo renal de humanos (DENKER et al., 1988; SMITH e AGRE, 1990; PRESTON e AGRE, 1991; AGRE et al., 1993). Estudos com tal proteína revelaram que as aquaporinas seriam homólogas a outra proteína formadora de canal, a MIP26 (*major intrinsic protein 26 kDa*) presente na córnea de bovinos e outros mamíferos (GORIN et al., 1984). Contudo, enquanto a MIP26 conduz íons através da membrana (GORIN et al., 1984) a CHIP28 se mostrou permeável apenas a moléculas de água quando expressa em oócitos de *Xenopus laevis* (PRESTON et al., 1992; AGRE et al., 1993).

Outras proteínas integrais de membrana com função de transporte, homólogas às aquaporinas (PAO et al., 1991; AGRE, SASAKI e CHRISPEELS, 1992) formam uma grande família de proteínas denominada MIP (*major intrinsic protein*) (PAO et al., 1991). Entre os membros desta família podemos citar: NOD (*nodulina-26*) em soja (SANDAL e MARCKER, 1988), GLP (*glycerol facilitator*) em *Escherichia coli* (MURAMATSU e MIZUNO, 1989), TIP (*tonoplast intrinsic protein*) na membrana de vacúolos de células

de plantas (JHONSON et al., 1990) e BIB (*Big Brain*) no sistema nervoso de *Drosophila melanogaster* (RAO, JAN e JAN, 1990).

A estrutura de proteínas da família MIP é composta por seis domínios transmembrana (1-6) e 5 alças (A-E) (figuras 8A e 8B) (PAO et al., 1991; PRESTON e AGRE, 1991). Curiosamente, os domínios transmembrana 1-3 são muito similares aos domínios 4-6, respectivamente, assim como as alças A e B são similares as alças D e E, respectivamente, revelando uma possível homologia interna entre dois segmentos maiores ((i) da extremidade amino terminal até o domínio 3 e (ii) domínio 4 até a extremidade carboxi terminal) (figuras 8A e 8B) com orientação de 180° entre eles, isto é, invertida em relação ao eixo da membrana plasmática (PAO et al., 1991; PRESTON e AGRE, 1991; AGRE et al., 1993).

A forma da proteína CHIP28 funcional foi proposta por Jung e colaboradores em 1994, e chamada de modelo da ampulheta (*hourglass model*) (figura 9A) devido à forma semelhante a este instrumento. Nesse modelo, as alças B e E, que são levemente hidrofóbicas (PRESTON e AGRE, 1991; AGRE et al., 1993) se dobram para dentro da membrana plasmática (figura 8B) e o domínio 6 se aproxima dos domínios 1 e 2, assim como o domínio 3 se aproxima dos domínios 4 e 5 (figura 8B e 9B) (JUNG et al., 1994).

O resultado final é a aproximação de dois motivos Asn-Pro-Ala (asparagina-prolina-alanina ou NPA) presentes nas alças B e E, os quais formariam uma constrição por onde seria possível a passagem de moléculas de água (figura 9A) (JUNG et al., 1994).

Estudos bioquímicos já sugeriam que aquaporinas poderiam existir como tetrâmeros (SMITH e AGRE, 1991) com os motivos NPA de cada monômero centralizados (figuras 9B e 9C); apesar de cada monômero, individualmente, ser capaz do transporte de água (VAN HOEK et al., 1991).

Figura 8. Topologia proposta para CHIP28. (A) Topologia da proteína na membrana plasmática. (B) Devido a leve hidrofobicidade, as alças B e E se dobram, posicionando-se na bicamada lipídica da membrana.

Figura 9. Modelo da ampulheta e tetrâmero de aquaporinas. (A) Organização tridimensional de CHIP28 na membrana plasmática em uma estrutura semelhante a uma ampulheta (retirado de Goldsmith et al., 2012). (B) Homotetrâmero de uma aquaporina com os motivos NPA voltados para o centro do canal (retirado de Ho et al., 2009)

Os domínios transmembrana (1-6) assumiriam a forma de barril (α barrel) com grupos carboxílicos dos resíduos de aminoácidos orientados para o interior do canal, formando ligações (pontes) de hidrogênio com um único filete de moléculas de água que passam pelo canal (figura 10) (MURATA et al., 2000; DE GROOT e GRUBMÜLLER, 2001; TAJKHORSHID et al., 2002; SAVAGE et al., 2003; FU e LU, 2007).

Ao centro do canal, a conformação do motivo NPA faz com que o grupo amina presente no resíduo de asparagina interaja especificamente com o oxigênio da molécula de água, deixando-a ortogonalmente orientada no canal. A consequência é que a molécula de água no motivo NPA não é capaz de interagir com outras moléculas de água, em seguida girando em 180° sua orientação de entrada no canal, de modo que o átomo de oxigênio esteja sempre voltado para o centro do canal (MURATA et al., 2000; DE GROOT e GRUBMÜLLER, 2001; TAJKHORSHID et al., 2002; SAVAGE et al., 2003; FU e LU, 2007).

Distante cerca de 10 Å do motivo NPA em direção ao lado extracelular se encontra uma segunda constrição, de cerca de 3 Å de diâmetro. Esta região chamada ar/R, devido à presença de resíduos aromáticos e a de uma arginina em posições conservadas, garante a seletividade do canal a água. A polaridade dos resíduos desta região influencia no diâmetro da constrição, resíduos mais polares resultam em um menor diâmetro (maior permeabilidade a água em detrimento de outros solutos) e resíduos mais apolares resultam em diâmetros maiores (favorecendo outros solutos como glicerol e ureia, além de diminuir a permeabilidade a água) (MURATA et al., 2000; DE GROOT e GRUBMÜLLER, 2001; TAJKHORSHID et al., 2002; SAVAGE et al., 2003; FU e LU, 2007).

Figura 10. Esquema do transporte de água através da aquaporina CHIP28. (A) Orientação das moléculas de água no canal e os motivos NPA e ar/R. O sentido da seta vermelha se refere ao dipolo da molécula de água, sendo a base o polo negativo (átomo de oxigênio) e a cabeça da seta o polo positivo (átomos de Hidrogênio). Elipses cinzas representam resíduos apolares. Adaptado de de Groot e Grubmüller, 2001. (B) Diagrama mostrando como cargas positivas do grupo amina do resíduo de asparagina no motivo NPA mudam a orientação da molécula de água (repare o giro de 180° da molécula no motivo NPA). Retirado de Murata et al., 2000. IN: face interna da membrana plasmática, OUT: face externa da membrana plasmática.

Exatamente 20 anos após a primeira descrição de CHIP28, e 15 anos após a proposição do termo aquaporina para descrever, exclusivamente, proteínas integrais de membrana que facilitam o movimento de água através da célula (DENKER et al., 1988; AGRE, SASAKI e CHRISPEELS, 1993) o conhecimento adquirido sobre tais canais aumentou consideravelmente. Não apenas o número de proteínas desta família subiu, mas também a grande variedade de organismos que as possuem, desde bactérias e arqueias, até os vertebrados (CAMPBELL et al., 2008; FINN e CERDÀ, 2015). Atualmente a proteína CHIP28 é denominada AQP1 - uma entre as dozes aquaporinas conhecidas na espécie humana (CAMPBELL et al., 2008; FINN e CERDÀ, 2015).

Além da diversidade de organismos e tecidos nos quais são encontradas aquaporinas específicas, a diversidade funcional também cresceu. Atualmente, também podem ser chamadas de aquaporinas proteínas da família MIP que transportam glicerol, ureia, íons e inclusive gases (CAMPBELL et al., 2008; FINN e CERDÀ, 2015). A própria AQP1 já foi observada sendo permeável ao gás carbônico entre outros gases (FINN e CERDÀ, 2015).

Essas observações levaram ao grande interesse na evolução de proteínas da família. Em um trabalho de 2015, Finn e Cerdà propõem uma árvore fazendo subdivisão de proteínas MIPs (figura 11) em quatro classes, e concluem que a diversidade de moléculas capazes de atravessar aquaporinas está começando a romper a relação entre funcionalidade e sua ancestralidade (FINN e CERDÀ, 2015). Por exemplo, verificou-se que um transportador de glicerol recentemente identificado em insetos é derivado de uma classe de proteínas transportadoras de água (aquaporina *típica*) (FINN e CERDÀ, 2015).

É possível que os eventos de diversificação de aquaporinas tenham ocorrido independentemente em cada grupo taxonômico (plantas, animais, bactérias, etc), explicando toda a diversidade funcional e de moléculas encontrada nessa família (FINN e CERDÀ, 2015).

Figura 11. Filogenia de aquaporinas. Os quatro grupos propostos são Aquaglyceroporinas, em grande parte formada por transportadores de glicerol. Aquaporinas não ortodoxas, com o motivo NPC ao invés do canônico NPA, além da substituição da arginina por uma leucina na constrição ar/R. Aquamonioporinas que possuem permeabilidade a amônia, e alguns ácidos orgânicos. E as clássicas aquaporinas, estudadas por mais tempo (retirado de Finn e Cerdà, 2015).

2. Hipótese

2.1 Hipótese do Trabalho

A primeira hipótese é que o nematoide anidrobiótico *Panagrolaimus superbus* é tolerante a altas concentrações de D₂O devido aos seus mecanismos naturais de reparo e resiliência a estresses físico-químicos. A segunda hipótese é que suas aquaporinas, assim como a de outros anidrobiontes apresentam alguma particularidade em sua estrutura primária.

3. Objetivos

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivos Gerais

Testar a hipótese de tolerância de *P. superbis* a exposições agudas e crônicas a D₂O e realizar uma análise comparativa entre as sequências primárias de aquaporinas de anidrobiontes *versus* não anidrobiontes de todos os reinos.

3.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade e o crescimento populacional de populações de *P. superbis* após a exposição a 99,9% D₂O por 24h;
- Avaliar a viabilidade e o crescimento populacional de populações de *P. superbis* dessecadas e reidratadas a 99,9% D₂O;
- Avaliar se populações de *P. superbis* expostas a 99,9% D₂O por 24h mantêm a capacidade de entrar em anidrobiose;
- Avaliar a viabilidade, crescimento populacional e desenvolvimento das fases do ciclo de vida de populações em meios 10% e 40% deuterados;
- Avaliar a possibilidade de manutenção da espécie em meios de cultura 10%, 40% e 99,9% D₂O;
- Identificar as sequências de EST (*expressed sequence tag*) de aquaporinas de *P. superbis*;
- Identificar *in silico* eventuais diferenças na estrutura primária de aquaporinas de espécies anidrobióticas e não anidrobióticas.

4. Materiais e Métodos

4.1 Manutenção de *P. superbus*

4.1.1 Manutenção de Laboratório

Os vermes foram mantidos em placas de petri contendo meio NGM (*Nematode Growth Medium*) ágar com uma camada de bactérias *Eschechiria coli* da linhagem OP50 para alimentação, a 15 °C no escuro.

4.1.2 Meios e soluções deuterados

Foram preparados meios e soluções em diferentes concentrações de óxido de deutério: (i) Meio LB para crescimento de bactérias *E. coli* OP50 a concentrações de 10%, 40% e 99,9% D₂O, (ii) meio NGM em concentrações 10%, 40% e 99% D₂O, e (iii) tampão fisiológico M9 a concentrações de 10%, 40% e 99,9% D₂O. Em todos os casos a concentração foi atingida por uma razão de volume com H₂O destilada.

4.2 Obtenção de população homogênea (sincronização) de *P. superbus*

Uma cultura mista de *P. superbus* (isto é, contendo machos e fêmeas em todas as etapas do ciclo de vida) é coletada do meio NGM com tampão M9 (a porcentagem de deuteração será citada conforme o experimento específico a partir do item 4.7, anteriormente a isso a menção é apenas para descrição geral de procedimentos) e lavada três vezes (com M9) para retirada do excesso de bactérias. Cada lavagem é composta por um período de 10 minutos (decantação dos vermes e ovos), retirada do sobrenadante e adição de um volume de M9 (20-30 mL).

Após a lavagem, a população é exposta a uma solução de *bleaching* (0,5 M NaOH e 0,09% NaClO) por um período de 7-9 minutos, com agitação em aparelho *vortex* a cada minuto. A solução de *bleaching* desintegra os vermes em solução restando apenas os ovos. Ao fim de nove minutos, a solução é centrifugada a 2.325 x g, o sobrenadante é retirado e foram adicionados 5 mL de H₂O destilada. Este processo se repete três vezes para lavagem da solução de *bleaching*.

Os ovos são plaqueados em meios de cultura NGM como descrito no item 4.1.1. Após 24h-72h a 20 °C obtém-se uma população homogênea (sincronizada) no estágio L2 do ciclo de vida (EVANGELISTA, 2011; GUIDELLI, 2011).

4.3 Ensaio de dessecação

Uma população (mista ou sincronizada) de *P. superbis* é coletada e lavada como já descrito anteriormente. Com a utilização de um funil de Sartório tal população é imobilizada em filtro Supor 0,45 µm (Sigma-Aldrich, Z269255). O filtro é depositado em um microtubo de 1,5 mL o qual passa por etapas de 24h em diferentes umidades relativas.

A primeira etapa é chamada de ‘pré-dessecação’ e ocorre em uma câmara com CuSO₄ (98% umidade relativa). A segunda etapa, chamada de ‘dessecação total’, ocorre em uma câmara com sílica gel (10% umidade relativa). A terceira etapa, pré-reidratação, ocorre em uma câmara com tampão M9, entretanto o filtro não fica em contato direto com a solução (100% umidade relativa). Na última etapa, reidratação total, o filtro é mergulhado em solução M9. Todas as etapas foram realizadas a 20 °C

4.4 Determinação da viabilidade

A determinação da viabilidade foi realizada via coloração com uma solução de Eritrosina B (Sigma-Aldrich) 0,04% em tampão M9 por pelo menos 1h. Após esse período são realizadas lavagens para a retirada do excesso de corante até a solução ficar translúcida. A morte dos indivíduos promove a perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática, quando isso ocorre a molécula do corante, naturalmente impermeável, é capaz de entrar nas células mortas, corando-as. O resultado (apêndice B) é a distinção dos vermes mortos (corados) dos vermes vivos (não corados), permitindo o cálculo da viabilidade, uma razão entre os vermes vivos e o total de vermes da amostra.

4.5 Determinação das fases do ciclo de vida

Uma população de *P. superbis*, coletada e lavada, é analisada em microscópio ótico, e com auxílio do *software* ScopePhoto são tiradas fotos. Ainda com o ScopePhoto é possível a mensuração da espessura de cada indivíduo no ponto médio de seu

comprimento, determinando assim a etapa do ciclo de vida (apêndice C). A tabela 2 demonstra os intervalos de espessura e a respectiva etapa do ciclo de vida.

Tabela 2. Determinação das etapas do ciclo de vida de *P. superbis* com base na espessura. L1-L4 (larvas 1 a 4), A (adulto). Adaptado de Evangelista, 2011.

Etapa do ciclo de vida	Espessura (µm)
L1	10,02 < L1 < 14,06
L2	16,77 < L2 < 20,35
L3	23,38 < L3 < 31,86
L4	37,42 < L4 < 41,94
A	A > 48,19

4.6 Determinação do crescimento populacional

O crescimento populacional foi calculado após 5, 10 e 15 ou após 14 e 28 dias depois dos tratamentos (dependendo do experimento). A razão de crescimento é determinada a partir da quantidade de vermes após 5, 10 e 15 ou 14 e 28 dias dividido pela quantidade inicial de vermes na mesma placa de cultura. Além disso, o número final (*output*) é multiplicado pela respectiva viabilidade da população, assim como o número inicial (*input*) é multiplicado pela viabilidade logo após os tratamentos. Portanto, o cálculo final é:

$$\text{Razão Crescimento} = \frac{(\text{output} * \text{viabilidade final})}{(\text{input} * \text{viabilidade inicial})}$$

4.7 Experimentos de exposição crônica a D₂O

Para os experimentos de exposição crônica, os meios de cultura NGM e as bactérias OP50 usadas na alimentação da população estavam a 10%, 40% ou 99,9% D₂O. As bactérias podem ser deuteradas crescendo-as em meio de cultura também deuterado (KATZ, 1960). Duas estratégias de exposição crônica foram realizadas: (i) manutenção de curto prazo e (ii) manutenção de laboratório.

4.7.1 *Manutenção de curto prazo*

Uma população homogênea de *P. superbus* na fase L2 do ciclo de vida foi coletada do meio de cultura, lavada com tampão M9 (M9 10% ou 40% deuterado, dependendo do grupo) e plaqueada novamente em placas de 12 poços (figura 12) com meios de cultura NGM a 10% e 40% D₂O, além do controle negativo não deuterado. As placas foram mantidas a 20 °C no escuro.

O número inicial de larvas (*input*) foi contabilizado e após 5, 10 e 15 dias a população de cada poço foi coletada e lavada com M9 (não deuterado). O número final (*output*), viabilidade e o perfil do desenvolvimento da população foi mensurado.

4.7.2 *Manutenção de laboratório*

Uma população mista de *P. superbus* foi coletada e lavada com M9 (M9 10%, 40% ou 99,9% deuterado, dependendo do grupo) e imobilizada em filtros. Os filtros foram submetidos ao ensaio de dessecação com as etapas de pré-reidratação e reidratação total em M9 10%, 40% ou 99,9% D₂O, além do controle não deuterado.

Após o ensaio de dessecação os vermes foram plaqueados em placas tripartidas (figura 13) e o número inicial de vermes (*input*) foi contabilizado. As placas foram mantidas a 20 °C por duas semanas (14 dias). A população foi coletada com M9 (M9 10%, 40% ou 99,9% dependendo do grupo), o número final de vermes (*output*) e a viabilidade também foram mensuradas, e aproximadamente 100 indivíduos foram colocados em novas placas, com as mesmas concentrações de D₂O. Após mais duas semanas (28 dias) a 20 °C, o procedimento de mensuração do número final de vermes e viabilidade foi repetido.

Figura 12. Placa de 12 poços utilizada nos experimentos de manutenção de curto prazo. Os poços em cinza foram utilizados nos experimentos.

4.8 Experimentos de exposição aguda a 99,9% D₂O

Três estratégias de exposição aguda foram realizadas: (i) imersão em M9 99,9% D₂O por 24h, (ii) imersão em M9 99,9% D₂O seguida de ensaio de dessecação e (iii) ensaio de dessecação com as etapas de reidratação em M9 99,9% D₂O

4.8.1 Imersão em 99,9% D₂O

Uma população homogênea de *P. superbus* na fase L2 do ciclo de vida foi coletada do meio de cultura, lavada com tampão M9 (não deuterado) e imobilizada em filtros (item 4.3). Tais membranas foram imersas em M9 99,9% D₂O, e o respectivo controle em M9 não deuterado.

Após o período de 24 horas no escuro, as larvas foram plaqueadas em placas de petri tripartidas (figura 13), foi contado o número de larvas inicial (*input*), assim como

também foi mensurada a viabilidade logo após o tempo de imersão. As placas de petri foram mantidas a 20 °C no escuro.

Dados de viabilidade e número final de vermes (*output*) foram coletados com M9 (não deuterado) após 5, 10 e 15 dias para análise de crescimento da população (ver item 4.6).

Figura 13. Placa tripartida utilizada nos experimentos imersão e reidratação a 99,9% D₂O. Cada repartição representa uma replicata técnica da mesma replicata biológica de um dos tratamentos.

4.8.2 Ensaio de dessecação após imersão em 99,9% D₂O

Uma população mista de *P. superbus* é coletada e lavada com M9 (não deuterado) e imobilizada em filtros. Os filtros são imersos em M9 99,9% D₂O por 24h e o controle negativo em M9 não deuterado por 24h. Após as 24 horas, os vermes são imobilizados novamente em filtros diferentes e submetidos ao ensaio de dessecação com as etapas de pré-reidratação e reidratação total feitas com M9 não deuterado em ambos os grupos.

Apenas viabilidade após o ensaio de dessecação foi mensurada.

4.8.3 Reidratação em 99,9% D₂O

De maneira semelhante ao experimento de Imersão (item 4.8.1), uma população homogênea de *P. superbus* na fase L2 do ciclo de vida foi coletada, lavada com M9 (não deuterado) e imobilizada em filtros.

As larvas são submetidas ao ensaio de dessecação, com as etapas de pré-reidratação e reidratação total em M9 99,9% D₂O e o controle negativo em M9 não deuterado. Após o desafio de dessecação, a coleta de dados foi semelhante ao item 4.8.1.

4.9 Análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicatas biológicas, sendo cada replicata biológica composta por triplicatas técnicas para geração de médias e desvios-padrão.

A comparação entre dois tratamentos foi realizada pelo teste *T* de Student. Quando mais de dois tratamentos foram analisados de maneira simultânea, utilizou-se o teste ANOVA (análise de variância) com teste de Tukey a posteriori. Em todos os casos diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$

4.10 Análise *in silico* da aquaporina de *P. superbus*

Podem ser encontrados na **tabela 3** todos os números de acessos das sequências obtidas dos bancos de dados (National Center for Biotechnology Information - NCBI; WormBase - wormbase.org; NEMBASE4 - <http://www.nematodes.org/nembase4/> e MirBase – mirbase.org).

4.10.1 Identificação de ESTs de aquaporinas em *P. superbus*

As informações genéticas em bancos de dados disponíveis para a espécie *Panagrolaimus superbus* estão disponibilizadas no NEMBASE4, e se resumem a ESTs (*expressed sequence tag*).

A identificação de ESTs correspondentes a aquaporinas foram realizadas a partir de tBlastn[®] de proteínas aqp (aquaporinas) do nematoide *Caenorhabditis elegans* presentes no wormbase.org.

Via Blastx[®] dos ESTs identificados em *P. superbus* foram encontradas uma série de proteínas aquaporinas mais semelhantes em várias espécies anidrobióticas e não anidrobióticas de vários reinos biológicos (apêndice D).

Tabela 3. Espécie, número de acesso e identidade das sequências listadas nesta seção. Uma lista completa com todas as sequências utilizadas para esta dissertação pode ser encontrada no apêndice D. “NA”: o banco de dados não possui a sequência.

Espécie	Identidade	Natureza da sequência	Número de Acesso		
			NCBI	WormBase	NEMBASE4
<i>A – Panagrolaimus superbus</i>	Major Intrinsic Protein	EST	GW411914.1	NA	PSC01029
	Major Intrinsic Protein		GW408200.1		PSC01205
	Actin		GW409906.1		PSC00457
	Actin		GW408900.1		PSC00129
	Actin		GW413418.1		PSC04662
	Actin		GW407433.1		PSC04111
	40S Ribossomal ptn S2		GW408938.1		PSC02975
	Histona H3		GW407989.1		PSC00363
	Histona H3		GW406999.1		PSC02234
	Histona H3		GW411817.1		PSC00196
	GPD-3		GW410829.1		PSC01471
<i>A – Caenorhabditis elegans</i>	aqp-2a	RNA	NM_063571.4	WBGene00000170	NA
	AQP-2a	Proteína	NP_495972.1		
	Actin-1		NP_505819.1	WBGene00000063	
	40S Ribossomal ptn S2		NP_501322.1	WBGene00004471	
	GPD-3		NP_508534.3	WBGene00001685	

4.10.2 Alinhamentos de proteínas

Os alinhamentos de proteína e ácidos nucleicos foram realizados no *software* online Clustal Omega[®] (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (SIEVERS et al., 2011; MCWILLIAN et al., 2013; LI et al., 2015) e no *software* BioEdit[®] (HALL, 1999).

4.9.2.1 Alinhamento de ESTs de *P. superbus* e de AQP2a de *C. elegans*

Os alinhamentos foram realizados no Clustal Omega[®] com as configurações padrão. Cinco sequências de proteínas foram obtidas: (i) EST GW411914.1 (NCBI) de *P. superbus* na fase de leitura +3, (ii) EST GW408200.1 (NCBI) de *P. superbus* na fase de leitura -1, (iii) EST GW408200.1 (NCBI) de *P. superbus* na fase de leitura -2, (iv) AQP 2a de *C. elegans* (NP_495972.1) (NCBI) e (v) EST GW408200.1 (NCBI) de *P. superbus* na fase de leitura -1 editada, de modo que, a região da fase de leitura -2 alinhada substituiu as posições correspondentes na proteína com fase de leitura -1 (figura 14).

Os alinhamentos produzidos dois a dois foram: (i)-(iv); (ii)-(iv); (iii)-(iv); (i)-(v); (iv)-(v). Os alinhamentos múltiplos foram: (i)-(ii)-(iii)-(iv); (i)-(ii)-(iii); (i)-(iv)-(v).

Figura 14. Edição da tradução do EST GW408200.1 de *P. superbus*. As regiões do EST traduzidos que se alinham a AQP 2a de *C. elegans* estão representadas pelas caixas coloridas em azul e rosa. Note que a proteína editada é composta, majoritariamente, pela sequência da tradução na fase -1, com exceção das posições alinhadas da fase -2.

4.9.2.2 Alinhamento de aquaporinas de espécies anidrobióticas

O alinhamento foi realizado no Clustal Omega[®] com as configurações padrão. Para este alinhamento foi considerado apenas a sequência do EST GW411914.1 (NCBI) de *P. superbus* na fase de leitura +3 e as proteínas mais semelhantes a esta encontradas via Blastx[®] em onze espécies anidrobióticas (*Panagrolaimus superbus*, *Caenorhabditis elegans*, *Ramazzottius varieornatus*, *Hypsibius dujardini*, *Polypedilum vanderplanki*, *Dorcoceras hygrometricum*, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Schizophyllum commune*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Deinococcus radiodurans*, *Listeria* e *Clostridium sporogenes*) de todos os reinos *Animalia*, *Plantae*, *Fungi* e *Monera*. Os números de acesso das sequências proteicas estão listados na tabela 3 no apêndice D.

4.9.2.3 Alinhamento de aquaporinas de espécies não anidrobióticas

O alinhamento foi realizado no Clustal Omega[®] com as configurações padrão. Neste alinhamento foi considerado as proteínas mais semelhantes a EST GW411914.1 (NCBI) de *P. superbus* na fase de leitura +3 encontradas via Blastx[®] em quinze espécies não anidrobióticas (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Zea mays*, *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus bombycis*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Mycobacterium tuberculosis*) de todos os reinos biológicos. Os números de acesso das sequências proteicas estão listados no apêndice D.

4.9.2.4 Alinhamento entre aquaporinas de espécies anidrobióticas e não anidrobióticas

O alinhamento foi realizado tanto no Clustal Omega[®] com as configurações padrão, quanto no BioEdit[®] com a função ClustalW Multiple Alignment. Todas as sequências anteriores foram utilizadas nesse alinhamento. Sendo que para *P. superbus* somente o EST GW411914.1 (NCBI) foi considerado.

4.9.3 Precursor de microRNAs

A predição da estrutura secundária dos ESTs de *P. superbus* foi feita com a aplicação online *RNA folding form*[©] disponível em <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/rna-folding-form> e hospedado pelo *The RNA Institute* da *University of Albany* (ZUKER, 2003).

4.9.4 Regulação por microRNAs

Inicialmente uma procura na literatura por microRNAs que poderiam regular RNA mensageiros de aquaporinas de qualquer espécie foi feita. Blastn[®] (hospedado dentro da plataforma do mirbase) com os microRNAs encontrados foram realizados contra o banco de dados de microRNAs de *C. elegans* presente no mirbase.org para identificação de microRNAs similares em nematoides.

Os microRNAs com maior similaridade de *C. elegans* foram submetidas a uma análise *in silico* para identificar potenciais interações (hibridações) com: (i) EST GW411914.1 (NCBI) de *P. superbus*; (ii) EST GW408200.1 (NCBI) de *P. superbus* e (iii) mRNA de AQP 2a de *C. elegans* incluindo as regiões UTR (regiões não traduzidas) 5' e 3' (WBGene00000170) (wormbase) (figura 15).

A análise *in silico* (hibridação) foi feita no *software* online *RNA hybrid* disponível em <https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid> (REHMSMEIER et al., 2004) com as configurações para nematoides.

Figura 15. Procura por potenciais miRNAs reguladores de aquaporina de *P. superbus*. As etapas da análise *in silico* de possíveis microRNAs reguladores da aquaporina de *P. superbus*. Passo 1 se refere ao Blastn® dos microRNAs encontrados na literatura contra o banco de miRNAs de *C. elegans* realizado no próprio mirbase. O passo 2 se refere a hibridação no *RNA hybrid* com as configurações para nematoides.

4.9.5 Abundância relativa dos ESTs

A abundância relativa dos ESTs de *P. superbus* referentes a aquaporina foi medida a partir do cálculo de RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) com os dados dos ESTs presentes no NEMBASE4. A equação utilizada foi:

$$RPKM = \frac{(n^{\circ} \text{ de ESTs})}{[(\text{tamanho do contig}) * (n^{\circ} \text{ total de ESTs do banco de dados} / 10^6)]}$$

O valor de RPKM foi normalizado com o valor de RPKM da actina, e para fins de comparação foram obtidos os valores de RPKM da aquaporina 3 de *Homo sapiens* (disponíveis no NCBI) e os valores de FPKM (*Fragment Per Kilobase Million*) da aquaporina 2 de *C. elegans* (disponíveis no wormbase).

Os ESTs da actina de *P. superbus* foi obtido, de maneira semelhante, via tBlastn® da sequência de *C. elegans*.

O número de acesso das sequências utilizadas nesse tópico podem ser conferidos na tabela 3 e apêndice D.

5. Resultados

5.1 Exposição a óxido de deutério

5.1.1 Exposição crônica de curto prazo

A figura 16 mostra os resultados de vermes sincronizados que cresceram em meio de cultura NGM deuterado, nas concentrações de 10% (figuras 18A e 18B) e 40% D₂O (figuras 18C e 18D).

De maneira geral não foram encontradas diferenças no crescimento populacional de *P. superbus*, assim como no perfil de desenvolvimento em meios de cultura a 10% e 40% D₂O.

Figura 16. Exposição a 10% e 40% D₂O de maneira crônica por até 15 dias Não há diferença significativa entre os vermes crescendo com meios NGM deuterados ou não deuterados.

5.1.2 Exposição crônica de longo prazo

A figura 17 mostra os resultados de vermes que foram dessecados e reidratados com 10%, 40% e 99,9% D₂O e cultivados em placas com meio de cultura NGM nas respectivas concentrações de D₂O.

As figuras 17A evidenciam que não há queda na viabilidade de indivíduos reidratados a 10%, 40% e 99,9% (figura 17A).

Diferenças significativas no crescimento da população foram observados nos grupos de 10% e 40% após 28 dias (figura 17B e 17C). E após 14 e 28 dias na concentração de 99,9% (figura 17B e 17C).

Figura 17. Exposição de longo prazo de *P. superbis* em meios NGM com 10%, 40% e 99,9% D₂O. (A) viabilidade de vermes sincronizados dessecados e reidratados com M9 a 10%, 40% e 99,9% D₂O. (B) Razão de crescimento, para cada ciclo de duas semanas, de vermes não sincronizados cultivados em meios de cultura com 10%, 40% e 99,9% D₂O após 14 dias e 28 dias. A diferença estatística entre tratamentos está assinalada com diferentes letras e foram independentes para os dias 14 e 28. (C) Curva da razão de crescimento de vermes não sincronizados cultivados em meios de cultura com 10%, 40% e 99,9% D₂O após 14 dias e 28 dias. Os valores de 28 dias são o produto da multiplicação das razões de crescimento dos dois ciclos de duas semanas. O ‘*’ assinala a diferença estatística entre a razão de crescimento da concentração de 99,9% D₂O com os demais tratamentos que não diferem entre si. O ‘#’ assinala a diferença estatística entre a razão de crescimento do controle em H₂O com os demais tratamentos que não diferem entre si. As análises estatísticas foram independentes para os dias 14 e 28. Os resultados estatísticos foram obtidos pelo teste ANOVA com teste Tukey a posteriori.

Embora, quantitativamente, não houve alteração significativa no número de vermes após 14 dias nas concentrações de 10% e 40% D₂O, qualitativamente as placas apresentaram uma diferença em todas as concentrações deuteradas (figura 18). As populações cultivadas em H₂O após 14 e 28 dias apresentava um aspecto de fome, isto é,

a população havia consumido boa parte das bactérias da placa de cultivo (figuras 18A e 18B). Já as populações das placas deuteradas, 10%, 40% e 99,9%, não apresentavam tal aspecto, isto é, não haviam consumido muito da camada de bactéria da placa de cultivo (figuras 18C-H).

Figura 18. Micrografias representativas das placas de cultivo do experimento de manutenção a longo prazo após 14 dias e 28 dias. Quanto mais escuro o meio ao redor dos vermes (seta preta) maior a quantidade de bactérias. (A) População cultivada em H₂O após 14 dias. (B) População cultivada em H₂O após 28 dias. (C) População cultivada em 10% D₂O após 14 dias. (D) População cultivada em 10% D₂O após 28 dias. (E) População cultivada em 40% D₂O após 14 dias. (F) População cultivada em 40% D₂O após 28 dias. (G) População cultivada em 99,9% D₂O após 14 dias. (H) População cultivada em 99,9% D₂O após 28 dias. O círculo vermelho circunscreve ovos.

5.1.3 Exposição aguda a 99,9% D₂O

Inicialmente, na figura 19 está o resultado da viabilidade de grupos que foram lavados (para diluição) com e sem etapas de centrifugação. Após o período de exposição aguda ocorre a lavagem da solução de vermes para a diluição da concentração de D₂O.

Um dos grupos foi lavado com ciclos de centrifugação a 2000 x g por 30 segundos e outro passou por etapas de decantação de 1 hora para a lavagem. O resultado demonstra que não há alterações na viabilidade independentemente do modo de lavagem do D₂O.

Figura 19. Porcentagem de viabilidade de *P. superbus* dessecados e reidratados a 99,9% D₂O por 24h que passaram por etapas de centrifugação. Não há diferença significativa entre vermes lavados com ou sem etapas de centrifugação.

A figura 20 mostra o resultado de vermes que foram expostos a 99,9% D₂O (exposição aguda). A figura 20A é a viabilidade de vermes sincronizados imersos a M9 99,9% D₂O por 24h (exposição aguda de imersão em 99,9% D₂O). A figura 20B representa o crescimento da população de vermes previamente imersos a M9 99,9% D₂O por 24h e cultivados em meios NGM não deuterados (exposição aguda de imersão em 99,9% D₂O). A figura 22C é a viabilidade de vermes imersos a M9 99,9% D₂O por 24h e posteriormente dessecados (exposição aguda de ensaio de dessecação após imersão em 99,9% D₂O).

De maneira geral, não há alterações significativas na viabilidade de *P. superbus* (figuras 20A e 20C), apenas no crescimento populacional após 10 e 15 dias (figura 20B).

Figura 20. Resultado de vermes que foram imersos a 99,9% D₂O por 24h. (A) Viabilidade de vermes sincronizados imersos em M9 99,9% D₂O por 24h. (B) Razão de crescimento após 5, 10 e 15 dias de vermes sincronizados imersos em M9 99,9% D₂O por 24h e cultivados em meios NGM não deuterados. (C) Viabilidade de vermes não sincronizados que foram imersos em M9 99,9% D₂O por 24h e passaram pelo ensaio de dessecação cujas etapas de reidratação não foram deuteradas.

Vermes sincronizados que passaram pelo desafio de dessecação cujas etapas de reidratação foram a 99,9% D₂O também tiveram seu crescimento populacional, em meios NGM não deuterados, alterado após 10 e 15 dias alterados (exposição aguda de reidratação em 99,9% D₂O) (figura 21) (a viabilidade de vermes sincronizados após este tratamento está na figura 17B).

Figura 21. Crescimento populacional de vermes, sincronizados, dessecados cujas etapas de reidratação foram a 99,9% D₂O. Diferenças na razão de crescimento foram encontradas após 10 e 15 dias.

5.2 Análise de aquaporinas

Dois ESTs foram identificados a partir do tBlastn[®] da aquaporina 2a de *C. elegans* (tabela 3): GW411914.1 (NCBI) ou PSC01029 (NEMBASE4) e GW408200.1 (NCBI) ou PSC01205 (NEMBASE4).

5.2.1 Alinhamento de ESTs de *P. superbus* com AQP2a de *C. elegans*

Os alinhamentos de proteínas entre (i) GW411914.1 e *C. elegans* aquaporina 2 isoforma a (figura 22A) mostrou um *e value* de $1e^{-85}$ (Blastp[®]), (ii) GW408200.1 na fase -1 e *C. elegans* aquaporina 2 isoforma a (figura 22B) mostrou um *e value* de $1e^{-12}$ (Blastp[®]), (iii) GW408200.1 na fase -2 e *C. elegans* aquaporina 2 isoforma a (figura 22C) mostrou um *e value* de $6e^{-12}$ (Blastp[®]), (iv) GW411914.1 e a forma editada do EST GW408200.1 (ver figura 14) (figura 22D) mostrou um *e value* de $4e^{-46}$ (Blastp[®]) e (v) a forma editada do EST GW408200.1 e *C. elegans* aquaporina 2 isoforma a (figura 22E) mostrou um *e value* de $6e^{-21}$ (Blastp[®]).

Alinhamentos múltiplos de proteínas entre (i) os ESTs de *P. superbus* com *C. elegans* aquaporina 2 isoforma a, (ii) apenas os ESTs de *P. superbus*, e (iii) EST GW411914.1 com a forma editada do EST GW408200.1 e com *C. elegans* aquaporina 2 isoforma a podem ser vistos no apêndice F.

Figura 22. Alinhamentos dois a dois entre todas as sequências de proteínas geradas com os ESTs de *P. superbus* e com aquaporina 2 isoforma a de *C. elegans*. (A) A aquaporina 2 isoforma a de *C. elegans* está representada pela sigla Ce2a e o EST GW411914.1 na fase de leitura +3 está representado pela sigla ‘Ps+3’. (B) A aquaporina 2 isoforma a de *C. elegans* está representada pela sigla Ce2a e o EST GW408200.1 na fase de leitura -1 está representado pela sigla ‘Ps-1’. (C) A aquaporina 2 isoforma a de *C. elegans* está representada pela sigla Ce2a e o EST GW408200.1 na fase de leitura -2 está representado pela sigla ‘Ps-2’. (D) O EST GW411914.1 na fase de leitura +3 está representado pela sigla ‘Ps+3’ e a forma editada do EST GW408200.1 está representada pela sigla ‘PsEDT’. (E) A aquaporina 2 isoforma a de *C. elegans* está representada pela sigla Ce2a e a forma editada do EST GW408200.1 está representada pela sigla ‘PsEDT’. ‘*’ significa posição conservada entre todas as sequências alinhadas. ‘:’ significa conservação de fortes propriedades físico-químicas entre os resíduos de aminoácidos da posição. ‘.’ significa conservação de fracas propriedades físico químicas entre os resíduos de aminoácidos da posição. Os retângulos pretos evidenciam os motivos NPA quando presentes.

A figura 23 mostra o resultado do tBlastn[®] da aquaporina 2 isoforma a de *C. elegans* comparada com o EST GSW408200.1 de *P. superbus* evidenciando que as duas fases de leitura desse EST não se sobrepõem.

Sequence ID: [GW408200.1](#) Length: 493 Number of Matches: 2

Range 1: 235 to 399 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
48.5 bits(114)	2e-17	Compositional matrix adjust.	28/55(51%)	37/55(67%)	1/55(1%)	-2
Query 4	DKLRKFHIRKELLRAVLAEFTGTYLLCLIGLSVVAQKVLPRPEV-NEFIGVNVG				57	
	D++R K ++ ++ R LAEF GT +L LI SVVAQ VLP+ + N IGVNVG					
Sbjct 399	DRVVRKATLKHDIKRTALAEFFGTLVLVLIITSVVAQNVLPKAGLGNALIGVNVG				235	

Range 2: 56 to 163 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
42.4 bits(98)	2e-17	Compositional matrix adjust.	19/36(53%)	27/36(75%)	0/36(0%)	-1
Query 62	IVFGVAVSAKLSGGHINPAVSFAFLSVGQITIVQFI				97	
	I FG+A+ ++SGGHINPAV+ AFL +G I ++ I					
Sbjct 163	IAFGIALCIRISGGHINPAVTLAFLVLGAIRPIKAI				56	

Figura 23. tBlastn[®] da aquaporina 2 isoforma a de *C. elegans* com o EST GSW408200.1 de *P. superbus*. As duas fases de leitura do EST GSW408200.1 não se sobrepõem no resultado do tBlastn[®] e inclusive possui o mesmo valor de e , $2e^{-17}$.

5.2.2 Alinhamento de aquaporinas de anidrobiontes

A imagem 24 mostra o alinhamento de aquaporinas de anidrobiontes com maior similaridade ao EST GW411914.1 (NCBI) de *P. superbus* na fase de leitura +3. Por motivos de espaço a imagem corresponde a um *recorte do alinhamento*, isto é, não estão apresentadas as extremidades amino e carboxi de algumas proteínas.

O número de acesso de todas as sequências utilizadas nesse alinhamento, bem como a anotação e a espécie estão disponíveis no apêndice D.

[illegible]

Figura 24. Alinhamento múltiplo de aquaporinas de anidrobiontes. A ordem do alinhamento é dos blocos superiores para os inferiores e dos blocos da esquerda para direita. As espécies são, de cima para baixo: *Ramazzottius varieornatus* (tardígrado), *Hypsibius dujardini* (tardígrado), *Caenorhabditis elegans* (nematóide), *Panagrolaimus superbus* (nematóide), *Schizophyllum commune* (fungo), *Deinococcus radiodurans* (bactéria), *Clostridium sporogenes* (bactéria), *Polypedilum vanderplanki* (díptera), *Drosocera hygrothermophilus* (díptera), *Mesembryanthemum crystallinum* (planta). **: significa posição conservada entre todas as sequências alinhadas. *: significa conservação de fortes propriedades bioquímicas entre os resíduos de aminoácidos da posição. *: significa conservação de fracas propriedades bioquímicas entre os resíduos de aminoácidos da posição. Os retângulos pretos evidenciam os motivos NPA quando essenciais.

5.2.3 *Alinhamento de aquaporinas de não anidrobiontes*

A imagem 25 mostra o alinhamento de aquaporinas de não anidrobiontes. Assim como o alinhamento de anidrobiontes, esta imagem corresponde a um recorte do alinhamento.

O número de acesso de todas as sequências utilizadas nesse alinhamento, bem como a anotação e a espécie estão disponíveis no apêndice D.

Figura 25. Alinhamento múltiplo de aquaporinas de não andróbiontes. A ordem do alinhamento é dos blocos superiores para os inferiores e dos blocos da esquerda para a direita. As espécies são, de cima para baixo: *Escherichia coli* (bactéria), *Danio rerio* (peixe), *Xenopus laevis* (anfíbio), *Homo sapiens* (mamífero), *Rattus norvegicus* (mamífero), *Schizosaccharomyces pombe* (fungo), *Mycobacterium tuberculosis* (bactéria), *Drosophila melanogaster* (díptera), *Nicotiana tabacum* (planta), *Zea mays* (planta), *Arabidopsis thaliana* (planta), *Neurospora crassa* (fungo) e *Agrobacterium tumefaciens* (bactéria). * significa posição conservada entre todas as sequências alinhadas. ** significa conservação de resíduos de aminoácidos da posição. *** significa conservação de resíduos de aminoácidos da posição. Os retângulos pretos evidenciam os motivos NPA quando presentes.

5.2.4 Alinhamento de aquaporinas de anidrobiontes e não anidrobiontes

A imagem 26 mostra o alinhamento de aquaporinas de anidrobiontes e não anidrobiontes de maneira semelhante aos dois últimos alinhamentos (figuras 24 e 25), contudo este alinhamento foi realizado no *software* BioEdit®.

As tabelas 4 e 5 resumizam as principais diferenças entre os grupos (anidrobiontes e não anidrobiontes) baseadas no alinhamento no BioEdit® e no clustal ômega® (figura não mostrada). O apêndice G mostra a estrutura terciária de uma aquaporina de uma espécie anidrobiótica e de uma espécie não anidrobiótica.

Figura 26. Alinhamento múltiplo de aquaporinas de anidrobiontes e não anidrobiontes. A ordem do alinhamento é dos blocos superiores para os inferiores. As espécies são as mesmas dos alinhamentos das figuras 27 e 28. O *threshold* utilizado foi de 92%, o mínimo necessário para destacar os motivos NPA em todas as espécies.

Tabela 4. Diferenças nas aquaporinas de não anidrobiontes em posições totalmente conservadas em aquaporinas de anidrobiontes. As células destacadas significam bases diferentes das conservadas em anidrobiontes. “-” significa deleção na posição. A posição 569 e 570 faz parte de um motivo NPA.

Espécie / Posição	364	427	432	569*	570*
<i>Homo sapiens</i>	A	H	V	P	A
<i>Rattus norvegicus</i>	A	H	V	P	A
<i>Mus musculus</i>	A	H	V	P	A
<i>Xenopus laevis</i>	A	H	V	P	A
<i>Danio rerio</i>	A	H	V	P	A
<i>Drosophila melanogaster</i>	G	H	I	P	T
<i>Arabidopsis thaliana</i> CAA53478.1	A	H	V	P	A
<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_181434.1	A	H	V	P	A
<i>Nicotiana tabacum</i>	A	H	V	P	A
<i>Zea mays</i>	A	H	V	P	A
<i>Neurospora crassa</i>	G	A	V	P	V
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	A	H	V	P	A
<i>Aspergillus pombe</i>	S	H	V	L	A
<i>Escherichia coli</i>	A	H	V	P	A
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	H	V	P	A
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	A	H	V	P	A

Tabela 5. Perda de propriedades físico-químicas semelhantes nas aquaporinas de não anidrobiontes em relação a aquaporinas de anidrobiontes. As células destacadas significam propriedades físico-químicas diferentes em relação a anidrobiontes.

Espécie / Posição	367 I / L / F	372 L/M/V/I	428 L/M/V/I	434 F/L/I	450 Y/F	464 L/M/V/I	573 F/L	577 L/V/I
<i>Homo sapiens</i>	L	I	L	F	Y	I	F	L
<i>Rattus norvegicus</i>	L	I	L	F	Y	I	F	L
<i>Mus musculus</i>	L	I	L	F	Y	I	F	L
<i>Xenopus laevis</i>	L	I	L	L	Y	L	L	F
<i>Danio rerio</i>	L	V	L	L	Y	A	L	L
<i>Drosophila melanogaster</i>	A	V	L	L	Y	L	L	V
<i>Arabidopsis thaliana</i> CAA53478.1	V	L	I	F	Y	F	F	V
<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_181434.1	I	L	I	F	Y	L	F	V
<i>Nicotiana tabacum</i>	V	L	I	F	Y	L	F	V
<i>Zea mays</i>	I	L	I	F	Y	L	F	V
<i>Neurospora crassa</i>	L	M	F	L	V	L	L	I
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	L	V	V	I	Y	L	F	M
<i>Aspergillus pombe</i>	F	I	I	L	Y	I	F	L
<i>Escherichia coli</i>	L	L	L	I	F	L	F	V
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	L	W	F	V	Y	A	T	L
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	A	I	I	V	Y	I	F	L

5.2.5 Precursor de miRNAs

A imagem 27 mostra a estrutura secundária do EST GW411914.1 (figura 27A) e do EST GW408200.1 (figura 27B).

Transcritos que dão origem a miRNAs são chamados de pri-miRNA (microRNA primário) e podem ter de centenas a milhares de nucleotídeos. Ademais, em algum ponto da estrutura secundária existe um grampo com comprimento de ~70 nucleotídeos (DENLI et al., 2004; MORLANDO et al., 2008; AXTELL, WESTHOLM e LAI, 2011).

As estruturas secundárias previstas de ambos ESTs tornam pouco provável seu processamento na via do biossíntese de microRNAs.

Figura 27. Estrutura secundária dos ESTs de *P. superbus*. (A) Estrutura secundária do EST GW411914.1. (B) Estrutura secundária do EST GW408200.1. (C) Estrutura secundária geral de microRNAs primários com os sítios de reconhecimento das principais enzimas responsáveis pela biossíntese de microRNAs (retirado de HAN et al., 2006).

5.2.6 Regulação por miRNAs

Fora encontrados cinco microRNAs em *C. elegans*, potencialmente similares a miRNAs de outras espécies e que alvejam os correlativos mRNAs de aquaporina.

A figura 28 mostra as hibridações do cel-mir-50-5p (MIMAT0000021) (mirbase.org) com: (i) o EST GW411914.1 (figura 28A) e (ii) RNA mensageiro completo do gene da aquaporina 2a de *C. elegans* (WBGene00000170) (wormbase) (figura 28B). E a figura 28C mostra os locais de hibridação nas sequências.

Figura 28. Hibridações do cel-mir-50-5p. (A) O EST GW411914.1 está representado pela sigla 'PsuperbusAQP'. (B) O RNA mensageiro da aquaporina 2 de *C. elegans* está representada pela sigla 'RNAmApp2Ce'. (C) A região grifada em amarelo é o local de hibridação no RNA mensageiro de *C. elegans* e a região grifada em verde é o local de hibridação no EST GW411914.1. Os retângulos vermelhos destacas os valores de mfe (minimun free energy ou energia livre mínima), quanto menor o valor deste coeficiente maior a probabilidade de hibridação.

A figura 29 mostra as hibridações do cel-mir-234-5p (MIMAT0020330) (mirbase.org) com: (i) o EST GW411914.1 (figura 29A), (ii) RNA mensageiro completo do gene da aquaporina 2a de *C. elegans* (WBGene00000170) (wormbase) (figura 29B). E a figura 31C mostra os locais de hibridação nas sequências.

Figura 29. Híbridações do cel-mir-234-5p. (A) O EST GW411914.1 está representado pela sigla ‘PsuperbusAQP’. (B) O RNA mensageiro da aquaporina 2 de *C. elegans* está representada pela sigla ‘RNAmAqp2Ce’. (C) A região grifada em amarelo é o local de hibridação no RNA mensageiro de *C. elegans* e a região grifada em verde é o local de hibridação no EST GW411914.1. Os retângulos vermelhos destacas os valores de *mfe* (*minimun free energy* ou energia livre mínima), quanto menor o valor deste coeficiente maior a probabilidade de hibridação.

A figura 30 mostra as hibridações do cel-mir-234-3p (MIMAT0000289) (mirbase.org) com: (i) EST GW411914.1 (figura 30A), (ii) RNA mensageiro completo do gene da aquaporina 2a de *C. elegans* (WBGene00000170) (wormbase) (figura 30B). E a figura 30C mostra os locais de hibridação nas sequências.

Figura 30. Hibridações do cel-mir-234-3p. (A) O EST GW411914.1 está representado pela sigla ‘PsuperbusAQP’. (B) O RNA mensageiro da aquaporina 2 de *C. elegans* está representada pela sigla ‘RNAm Aqp2Ce’. (C) A região grifada em amarelo é o local de hibridação no RNA mensageiro de *C. elegans* e a região grifada em verde é o local de hibridação no EST GW411914.1. Os retângulos vermelhos destacas os valores de mfe (minimun free energy ou energia livre mínima), quanto menor o valor deste coeficiente maior a probabilidade de hibridação.

A figura 31 mostra as hibridações do cel-mir-786-5p (MIMAT0015239) (mirbase.org) com: (i) o EST GW411914.1 (figura 31A), (ii) RNA mensageiro completo do gene da aquaporina 2a de *C. elegans* (WBGene000000170) (wormbase) (figura 31B). E a figura 31C mostra os locais de hibridação nas sequências.

Figura 31. Hibridações do cel-mir-786-5p. (A) O EST GW411914.1 está representado pela sigla ‘PsuperbusAQP’. (B) O RNA mensageiro da aquaporina 2 de *C. elegans* está representada pela sigla ‘RNAmAqp2Ce’. (C) A região grifada em amarelo é o local de hibridação no RNA mensageiro de *C. elegans* e a região grifada em verde é o local de hibridação no EST GW411914.1. Os retângulos vermelhos destacas os valores de *mfe* (*minimun free energy* ou energia livre mínima), quanto menor o valor deste coeficiente maior a probabilidade de hibridação.

5.2.7 Abundância relativa dos ESTs

A expressão relativa dos ESTs de *P. superbus* está na figura 33, conjuntamente com a expressão relativa das aquaporinas equivalentes em *C. elegans* e *Homo sapiens*. Em *C. elegans* a expressão ainda está subdividida nas diferentes fases do ciclo de vida, incluindo a fase anidrobiótica (*dauer*). Em *Homo sapiens* a expressão está representada em três diferentes tecidos: esôfago, rim e apêndice. Todos os valores de RPKM/FPKM foram normalizados com base no valor da expressão de actina respectiva de cada espécie, e nos casos de *C. elegans* e *H. sapiens* nas respectivas fases do desenvolvimentos e tecidos.

O apêndice J contém a expressão absoluta de *P. superbus* com inclusão dos genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD-3) e da proteína ribossomal S2 (40S Ptn S2) da subunidade 40S. O apêndice K contém a expressão absoluta em *C. elegans* com adição dos mesmo genes. O apêndice L contém a expressão absoluta em *Homo sapiens* com adição de mais tecidos, dos mesmo genes.

Figura 33. Valores de abundância relativa de aquaporinas de *H. sapiens*, *C. elegans* e *P. superbus*. O EST GW411914.1 está representado pela sigla ‘Ps+3’. O EST GW408200.1 está representado pela sigla ‘Ps-1-2’. ‘RPKM’: Reads per kilobase per million (leituras por 100 nucleotídeos por milhão).

6. Discussão

6.1 Exposição a óxido de deutério

Exposição a concentrações entre 40% a 50% D₂O são capazes de alterar biologia de modelos animais multicelulares, como *Drosophila melanogaster* (HUGHES, HILDRETH e BECKER, 1963; SAMIS, BAIRD e MASSIE, 1974; WHITE, RINGO e DOWSE, 1992; HAMMEL et al., 2013), ratos (THOMSON, 1960) e camundongos (KATZ et al., 1962). E em concentrações acima de 50% D₂O os efeitos aparentam ser mais drásticos uma vez que dos três casais de *Drosophila melanogaster* submetidos por Hughes, Hildreth e Becker (1963) a concentrações de 70% a 100% nenhum indivíduo foi capaz de sobreviver pelo período de três dias. Até mesmo em modelos unicelulares, como bactérias e algas, apresentam efeitos em seu crescimento (KATZ, 1962; HIRAI et al., 2010).

Entretanto, a exposição de organismos multicelulares a tais concentrações não garante que a troca da matriz de H₂O para D₂O seja *total* (isto é, atinja a mesma concentração daquela utilizada na exposição), nem que a concentração atingida seja *homogênea*, isto é, todo os tecidos estejam deuterados igualmente (KATZ et al., 1962). Além disso, a deuteração desses modelos não é *instantânea*, ou seja, é necessário um determinado tempo em condições deuteradas para se atingir a concentração desejada.

Nesse contexto o uso de espécies anidrobióticas em experimentos de exposição a óxido de deutério apresenta uma vantagem. A possibilidade de se dessecar um organismo a ponto de se retirar, virtualmente, toda a água presente no mesmo e reidratá-lo em concentrações conhecidas de óxido de deutério garante uma troca total, homogênea e instantânea da matriz aquosa.

Os diferentes tempos de exposição a D₂O realizados nessa dissertação com o nematoide *P. superbus*, 24h, 15 dias e 28 dias, correspondem a, respectivamente, 10%, 150% e 280% do tempo do ciclo de vida desta espécie, isto é, do tempo da eclosão a postura de ovos, e, também respectivamente, a 4%, 60% e 112% do tempo da longevidade de indivíduos da espécie (dados não publicados).

A variedade no tempo de exposição, principalmente em relação ao tempo de longevidade, permite, não apenas, a elucidação de possíveis alterações biológicas em diferentes tempos de exposição, mas também a elucidação de um eventual tempo limite de tolerância do modelo aos níveis de D₂O testados.

6.1.1 Viabilidade

Neste trabalho, a viabilidade do nematoide *Panagrolaimus superbus* foi investigada em dois cenários de exposição: (i) imersão em concentração de 99,9% por 24 horas e (ii) reidratação em concentrações de 10%, 40% e 99,9%.

Enquanto no primeiro cenário não houve troca total, homogênea e instantânea, no segundo foi possível realizar a deuteração nas concentrações desejadas.

Além disso, foi investigado se a viabilidade poderia ser afetada com a combinação da exposição a 99,9% com eventos de centrifugação e de entrada em anidrobiose.

Em nenhuma das condições citadas acima houve alteração na viabilidade do modelo (figuras 17A, 19, 20A e 20C), resultado congruente com experimentos prévios do nosso grupo de pesquisa, tanto ao se investigar a tolerância ao óxido de deutério (DE CARLI, 2015), quanto ao se investigar a tolerância a centrifugação (DE SOUZA, DE CARLI e PEREIRA, 2017).

Quando comparado com outros modelos, camundongos se mostram menos tolerantes, tendo sua viabilidade diminuída para menos de dois meses na concentração de 40% e cerca de 10 dias a concentrações de 80% D₂O (KATZ et al., 1962), sendo que o tempo de vida de uma camundongo pode chegar a até dois anos. Proporcionalmente, 10 dias no tempo de vida de um camundongo equivaleriam a menos de 24h do tempo de vida de *P. superbus*. O artrópode *Drosophila melanogaster* parece não ter sua viabilidade alterada significativamente em concentrações de 40% (HUGHES, HILDRETH e BECKER, 1963), contudo quando a concentração atinge 50%, a viabilidade é significativamente alterada em temperaturas de 10 °C e 20 °C (SAMIS, BAIRD e MASSIE, 1974) e em concentrações superiores a 50% a viabilidade foi de três dias (HUGHES, HILDRETH e BECKER, 1963). Os únicos modelos descritos na literatura a serem viáveis a concentrações de 99,9% D₂O são bactérias e algas unicelulares (KATZ, 1960 e HIRAI et al., 2010).

Os resultados desta dissertação sugerem que espécies anidrobióticas possuem uma maior tolerância a altas concentrações de D₂O que espécies não anidrobióticas. Particularmente, o nematoide *P. superbus* é considerado um estrategista rápido, isto é, não necessita de etapas de pré-condicionamento para entrar em anidrobiose, em contraste a espécies como o rotífero *Philodina roseola* (SHANNON et al., 2005).

É proposto que tais estrategistas rápidos expressem constitutivamente genes de resposta ao estresse hídrico. Este último, por sua vez, pode levar a outros estresses, como

oxidativo, de pH, osmótico e danos a biomoléculas (proteínas e ácidos nucleicos) (WOMERSLEY, 1987; REARDON et al., 2010).

Tyson e colaboradores (2012) identificaram mais de 180 sequências constitutivamente expressas em *P. superbis* relacionadas a genes com funções de proteção a estresses, dentre as sequências citadas pelos autores estão presentes proteínas efetoras (quinases), fatores de transcrição, proteínas antioxidantes, chaperonas moleculares (proteínas de choque térmico) e proteínas de resposta a danos no DNA.

Alternativamente, o tempo de exposição foi insuficiente para gerar danos a viabilidade. O período máximo de exposição a concentração de 99,9% foi de 28 dias (item 4.7.2 dos materiais e métodos) e após este período a população permaneceu com a mesma porcentagem de viabilidade da população controle (dados não mostrados). Experimentos com exposição com maior tempo de duração precisam ser conduzidos para avaliar efeitos mais crônicos.

6.1.2 Crescimento populacional

Já foi demonstrado que exposições a D₂O podem afetar o crescimento populacional de organismos.

Em *Drosophila melanogaster* a prole cujos parentais cresceram em concentrações de 40% e 50% D₂O não foram capazes de se reproduzir nas mesmas condições, levando a uma esterilização e consequentemente a interrupção do crescimento populacional (HUGHES, HILDRETH e BECKER, 1963).

Em espécies que toleram concentrações de 99,9% D₂O, como bactérias e algas unicelulares, o perfil de crescimento neta concentração apresenta uma fase *lag* mais prolongada e um platô menos elevado dependendo da espécie (figura 34) (KATZ, 1960; HIRAI et al., 2010). Isto significa que não apenas, nestas espécies, ocorre um retardamento do crescimento (fase *lag* mais prolongada), mas também pode ocorrer uma inibição do crescimento (platô menos elevado). Contudo, Katz (1960) observou que se o crescimento em meio deuterado for feito progressivamente o perfil de crescimento é semelhante ao controle em H₂O, revelando a possibilidade de uma capacidade adaptativa de bactérias e algas unicelulares ao crescimento em meio deuterado. O crescimento progressivo se daria com o crescimento primeiramente em concentrações de 10% D₂O, depois em concentrações de 20% D₂O e assim sucessivamente até se atingir a concentração de 99,9% ou 100%.

Figura 34. Comparação de crescimento populacional em meios deuterado e não deuterado. Gráfico geral demonstrado resultados de crescimento de bactérias e algas unicelulares em altas concentrações de D₂O. Note a prolongação da fase lag e fase platô menor na curva vermelha (99,9% D₂O).

O crescimento de *P. superbis* de maneira crônica em concentrações de 10% e 40% D₂O não se mostrou alterado, quando os indivíduos não passaram por uma troca total, homogênea e instantânea de sua matriz aquosa para as concentrações testadas em até 15 dias (figuras 16A, 16C).

Entretanto, quando os indivíduos foram dessecados e reidratados em concentrações de 10% e 40% D₂O a sua curva de crescimento apresentou uma das características da figura 34, um crescimento retardado foi observado após 28 dias (figura 17B e 17C).

Ademais, neste experimento de manutenção de laboratório as aparências das placas após 14 e 28 dias (figuras 18A-F) indicam que as placas 10% D₂O (figuras 18C-D) e 40% D₂O (figuras E-F) ficaram com uma maior quantidade de bactéria após ambos os períodos. Tal análise qualitativa sugere que o hábito alimentar da população em meios deuterados é menor, o que poderia explicar o crescimento retardado após 28 dias. Para a confirmação desta possibilidade serão necessários experimentos específicos de quantificação das bactérias presentes nessas placas de cultivo após esses períodos.

A mesma aparência das placas de 10% e 40% D₂O foi encontrada para as placas de 99,9% D₂O (figuras 18G-H) e, adicionalmente, o crescimento retardado esperado já foi observado após 14 dias (figura 17B e 17C).

Outros experimentos de exposição aguda investigaram se os prováveis danos causados pela exposição a 99,9% D₂O necessitam de uma troca total, homogênea e instantânea, assim como se apenas um período de 24h seria suficiente para observar o crescimento retardado. Os resultados obtidos quando uma população sincronizada é exposta a 99,9% D₂O, independentemente de uma troca total, homogênea e instantânea, demonstra que tal troca não é um pré-requisito para esta concentração, diferentemente para as concentrações de 10% e 40% D₂O. Além disso, um período de 24h é o suficiente para resultar em um crescimento retardado após 10 dias (figuras 20B e 21).

Então pode-se considerar que a exposição a concentrações de D₂O pode gerar algum dano na biologia de *P. superbus* tal que o crescimento da população se torna retardado. Em concentrações de 10% e 40% é necessário uma troca total, homogênea e instantânea para o efeito ser observado depois de 28 dias em exposição crônica. Contudo, exposição por 24h a concentrações de 99,9% podem gerar um dano maior (alterações no crescimento observadas após 10 dias) independentemente de troca total, homogênea e instantânea.

Embora o efeito causado pela exposição a D₂O tenha sido observado após 10 dias, o momento exato da ocorrência deste dano parece ser durante o tempo de exposição. Katz e colaboradores (1962) observaram que caso um organismo deuterado passe para um meio não deuterado, sua concentração corpórea de D₂O diminui. Tal queda é proporcional a deuteração, ou seja, os tecidos que mais rapidamente incorporam o D₂O são os que mais rapidamente o perdem. Em vista disso, mesmo desconhecendo a exata dinâmica do D₂O em *P. superbus*, é provável que no momento em que o efeito causado pelo D₂O foi observado (dia 10 das figuras 20B e 21) a concentração corpórea da água deuterada no nematoide não seja a mesma que a concentração logo após os tratamentos nos experimentos de exposição aguda.

Ademais, o tipo de dano que levaria ao retardamento do crescimento não pode ser elucidado claramente com os resultados obtidos neste trabalho. Contudo algumas possibilidades incluem a *fecundidade* dos indivíduos ou no *tempo de desenvolvimento*. A queda na fecundidade já foi observada em *Drosophila melanogaster* em concentrações de 10% a 50% D₂O (HUGHES, HILDRETH e BECKER, 1963; HAMMEL et al., 2013), todavia as figuras 18G-H, visualmente, não apontam alterações na postura de ovos, no

entanto apenas uma quantificação de tais ovos revelaria eventuais alterações. Outra possibilidade a ser investigada, neste contexto, é a taxa de eclosão dos ovos: mesmo que a postura de ovos seja equivalente, caso os ovos eclodam em uma menor taxa quando em altas concentrações de D₂O, o crescimento populacional seria menor, tal efeito já foi observado em drosófilas (HUGHES, HILDRETH e BECKER, 1963). O tempo de desenvolvimento será abordado no tópico seguinte.

Curiosamente, a razão de crescimento populacional de vermes que passaram pelo ensaio de dessecação (com reidratação em H₂O) e que cresceram em meios não deuterados (curva laranja da figura 21) foi de ~35 vezes após 15 dias, em média. Esse valor é significativamente maior que a razão de crescimento, no mesmo período, de vermes que também cresceram em meio não deuterado, mas sem passar pelo ensaio de dessecação (curva laranja da figura 20B), de ~20 vezes, em média. Esse resultado pode sugerir que passar pelo estado de anidrobiose poderia dar um impulso no crescimento populacional. Em ambos os experimentos, o *input* inicial de indivíduos foi o mesmo, e a população era composta majoritariamente por larvas no estado L2 do desenvolvimento, deixando, portanto, o crescimento comparável.

P. superbis é um nematoide de vida livre (não parasita) habitante desde solos profundos até mais superficiais. Tais solos superficiais são mais propensos a grandes variações de humidade, sendo a capacidade de entrar em anidrobiose uma vantagem adaptativa por si só. E após um período de estresse hídrico severo, as espécies sobreviventes que tiverem maior capacidade de recolonizar o microambiente teriam uma vantagem adicional na competição pelos recursos disponíveis naquele microambiente.

6.1.3 Desenvolvimento

A avaliação do desenvolvimento nesta dissertação se baseia em verificar se a progressão dos indivíduos durante o ciclo de vida permanece sem alterações após algum tratamento. Trabalhos anteriores realizados no laboratório de genética molecular da anidrobiose com *P. superbis* já investigaram os do ciclo de vida, bem como o intervalo de tempo das diferentes fases larvais do nematoide (EVANGELISTA, 2011; GUIDELLI, 2011).

O uso de uma população sincronizada, isto é., homogeneamente composta por indivíduos em uma mesma fase do ciclo de vida, permite uma melhor visualização de

efeitos no desenvolvimento (ou seja, de alterações no perfil das fases do ciclo de vida presentes na população).

A perspectiva do óxido de deutério causar alterações na progressão do ciclo de vida já foi reportada em *Drosophila melanogaster*. Em concentrações de 22,5% D₂O os indivíduos progrediram mais lentamente no seu desenvolvimento, ou seja, necessitaram de uma maior período de tempo para atingir a fase adulta, embora não tenham pulado nenhuma das fases do ciclo de vida. Isto resultou em um aumento da duração do ciclo de vida. Os autores não investigaram se alguma fase específica no desenvolvimento de drosófila foi mais sensível (HAMMEL et al., 2013).

Nas concentrações de 10% e 40% D₂O nas quais a análise do desenvolvimento foi avaliada nesta dissertação não foram encontradas alterações no perfil de desenvolvimento as populações deuteradas em relação ao controle após 5, 10 e 15 dias (figuras 16B e 16D). Contudo, o retardamento no crescimento populacional observado em concentrações de 99,9% D₂O (figuras 17C, 20B e 21) podem ter como causa um efeito adverso no desenvolvimento da população.

6.1.4. Tolerância a D₂O

Nosso grupo foi o primeiro a observar ausência de mortalidade de uma espécie multicelular após uma exposição a concentração de 99,9% D₂O por um período maior que três dias.

Ademais, também foi o primeiro grupo a obter uma troca total, homogênea e instantânea da matriz aquosa de H₂O por D₂O em uma espécie multicelular (DE CARLI, 2015).

O nematoide anidrobiótico *Panagrolaimus superbus* apresenta uma elevada tolerância a D₂O quando comparado a outras espécies multicelulares. Contudo, se tal tolerância é específica da espécie ou seria uma característica de organismos anidrobiotos (assim como a tolerância a extremos de temperatura, pressão e radiação ionizante) ainda precisa ser esclarecida.

O uso de anidrobiontes para estudo da tolerância a D₂O possui uma vantagem única, a opção de se realizar uma troca total, homogênea e instantânea. A vantagem de tal processo é um aumento na precisão dos protocolos experimentais, uma vez que o processo de deuteração de um organismo multicelular não é total, nem homogêneo e nem instantâneo.

O entendimento dos processos fisiológicos, bioquímicos e celulares que tornam *P. superbis* tolerante a D₂O não apenas podem revelar processos não contemplados pela engenharia anidrobiótica (EA), mas também ser uma nova forma de buscar aplicações de D₂O.

As propriedades físico-químicas de se alterar a cinética de reações enzimáticas ou inibir certos processos celulares possuem aplicações tecnológicas (KUSHNER, BAKER E DUNSTALL, 1999). O uso de drogas deuteradas, isto é, com substituição do hidrogênio por deutério em algumas posições (DIE) são facilmente detectáveis via espectrometria de massas e possuem baixa toxicidade se comparadas a compostos radioativos. Sendo, portanto, vantajosas no estudo do metabolismo e movimentação de compostos em organismos modelo (KUSHNER, BAKER E DUNSTALL, 1999).

Como um solvente (SIE), D₂O possui a capacidade de estabilizar proteínas, impedindo ou dificultando alterações estruturais. Nesse contexto, D₂O poderia ser utilizada para manutenção de vacinas com menor grau de refrigeração. Ainda como solvente, D₂O pode inibir a divisão celular estabilizando microtúbulos do fuso mitótico, tal propriedade pode ser explorada no tratamento de tumores (KUSHNER, BAKER E DUNSTALL, 1999).

Kushner e colaboradores (1999) exploram uma ampla visão de possíveis aplicações de D₂O.

Por fim, os resultados obtidos neste trabalho suportam a hipótese de que o nematoide anidrobiontes *Panagrolaimus superbis* é tolerante a altas concentrações de óxido de deutério (D₂O).

6.2 Aquaporinas

6.2.1 Proteínas codificadas pelos ESTs de *P. superbus*

Uma vez que a espécie *Panagrolaimus superbus* possui apenas *expressed sequence tag* (ESTs) em bancos de dados, a sequência proteica de aquaporinas para esta espécie pode apenas ser inferida via tradução *in silico* destes ESTs, e mesmo assim tal sequência proteica é incompleta devido à natureza dos ESTs.

A sequência proteica gerada pelo EST GW411914.1 na fase +3 de leitura foi a mais similar a uma aquaporina de *Caenorhabditis elegans*, nematoide modelo filogeneticamente próximo (ambos da ordem *Rhabdita*) (DE LAY e BLAXTER, 2002).

Curiosamente, o outro EST, GW408200.1, gerou sequências similares em duas fases de leitura (fases -1 e -2), porém com *e-values* bem mais elevados (figura 22) e sem sobreposição (figura 23). Isto nos levou a conjecturar sobre uma existência de uma mutação do tipo *frameshift* (mudança da fase de leitura). Assim, edições (artificiais) neste EST poderiam resultar na versão sem a mutação.

Baseando-se em *e-values*, essa sequência editada apresentou-se bem mais similar com a sequência da aquaporina 2 de *C. elegans* do que a não editada, mas não tão similar quanto a sequência da fase +3 do EST GW411914.1 (figura 22).

Além dos *e-values*, o EST GW411914.1 na fase +3 foi o único que apresentou os dois domínios NPA (tripeptídeo asparagina-prolina-alanina) alinhados com a aquaporina de *C. elegans* (figura 22A). O EST GW408200.1 na fase -1 possui apenas um motivo NPA e na fase -2 não possui nenhum motivo NPA (figuras 22B e 22C), isto sugeriria que a fase -2 no EST GW408200.1 emerge devido à mutação do tipo *frameshift*.

Conjuntamente, os *e-values*, a ausência de motivos NPA e as *fases negativas* de tradução do EST GW408200.1 sugerem fortemente que este EST não atua como um transcrito codificador de proteínas, mas alternativamente poderia ser um RNA não codificante ou um pseudogene.

6.2.2 *Aquaporinas de anidrobiontes e não anidrobiontes*

Ao se comparar as sequências primárias das aquaporinas de anidrobiontes como um grupo (figura 24), nota-se que poucas regiões parecem possuir algum grau de conservação. Uma análise quantitativa mostra que as proteínas da figura 24 possuem em média 307,5 resíduos de aminoácidos, dos quais 4,5% (14 resíduos) são totalmente conservados (marcados com ‘*’ nas posições da figura 24), 4,3% (13 resíduos) possuem conservação de fortes propriedades físico-químicas (marcados com “:” nas posições da figura 24) e 5,8% (18 resíduos) possuem conservação de fracas propriedades físico-químicas (marcados com ‘.’ nas posições da figura 24). Portanto, de 307,5 resíduos de aminoácidos (na média), 14,6% (45) posições possuem algum grau de conservação.

A mesma análise pode ser feita com as sequências primárias das aquaporinas de não anidrobiontes, também com poucas regiões que parecem possuir algum grau de conservação (figura 25). As proteínas de não anidrobiontes listadas nesta dissertação possuem, na média, 311 resíduos de aminoácidos, dos quais 3,5% (11 resíduos) são totalmente conservados (marcados com ‘*’ nas posições da figura 25), 4% (13 resíduos) possuem conservação de fortes propriedades físico-químicas (marcados com “:” nas posições da figura 25) e ~8% (24 resíduos) possuem conservação de fracas propriedades físico-químicas (marcados com ‘.’ nas posições da figura 25). Portanto, de 311 resíduos de aminoácidos (na média), 15,4% (48) posições possuem algum grau de conservação.

Uma vez que há interesse neste trabalho em buscar diferenças entre aquaporinas de anidrobiontes e não anidrobiontes buscou-se posições no alinhamento de aquaporinas de anidrobiontes com algum grau de conservação que perderam esse grau de conservação no alinhamento entre os dois grupos. Os resultados das tabelas 4 e 5 demonstram que essa situação ocorre, com a perda de conservação total em 5 posições (tabela 4) e de perda do grau de conservação de propriedades físico-químicas em 8 posições (tabela 5). Vale ressaltar que os números das posições são referentes às proteínas das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (anidrobionte) e *Schizosaccharomyces pombe* (não anidrobionte) que são as maiores de cada grupo. O tamanho acima do normal destas duas proteínas se deve ao longo comprimento de sua extremidade amino terminal presentes em algumas das aquaporinas de leveduras (TANGHE, VAN DIJCK e THEVELEIN, 2006; AHMADPOUR et al., 2014).

Das alterações, entres os grupos anidrobiontes e não anidrobiontes, mostradas pelo alinhamento (figuras 24-26) não são todas que poderiam levar a efeitos biológicos. As

posições assinaladas como 364 (tabela 4), 367 e 372 (tabela 5) estão localizadas no domínio transmembrana 1 (figuras 8 e 9A), e destas apenas a mudança na posição 364, de alanina (em anidrobiontes) para glicina ou serina em três táxons não anidrobiontes indica uma mudança de um resíduo hidrofóbico (alanina) para resíduos mais hidrofílicos.

As posições 427, 432 (tabela 4) e 428, 434 (tabela 5) estão localizadas na alça B (figuras 8 e 9A), uma das quais possui o motivo NPA. A alça B além de conter um dos motivos NPA também é caracterizada por promover uma anfipatia no canal do poro, onde as moléculas de água interagem com grupos carbonila (LU e FU, 2007). Nenhuma das posições com contraste entre anidrobiontes e não anidrobiontes na alça B levam a um aumento da hidrofobicidade. A exceção da posição 427 que na levedura *Neurospora crassa* tem a substituição de uma histidina, resíduo hidrofílico e positivamente carregado, para o resíduo alanina, hidrofóbico.

As posições 450 e 464 (tabela 5) estão localizadas no domínio transmembrana 3 (figuras 8 e 9A). Em anidrobiontes há a prevalência de resíduos aromáticos na posição 450 (tirosina e fenilalanina), particularmente da tirosina que possui grupamento fenol. Mais uma vez a levedura *Neurospora crassa*, que nesta posição possui um resíduo valina, é o único táxon a possuir um resíduo não aromático. Na posição 464 há a presença preferencial de resíduos hidrofóbicos em ambos os grupos.

As posições 569 e 570 (tabela 4) e 573 e 577 (tabela 5) estão localizadas na alça E (figuras 8 e 9A), uma das quais possui o motivo NPA. E assim como a alça B é caracterizada por promover uma anfipatia no canal do poro com os mesmos grupos carbonila (LU e FU, 2007). Na posição 577 a presença de fenilalanina em *Xenopus laevis* e metionina em *Schizosaccharomyces pombe* não promove grandes alterações em relação aos resíduos presentes nos anidrobiontes, visto que todas mantêm a hidrofobicidade da posição. Contudo, na posição 576, a treonina presente na bactéria *Agrobacterium tumefaciens* é mais hidrofílica do que a fenilalanina e a leucina presente nos anidrobiontes, podendo nesta bactéria tal posição fazer parte da face hidrofílica do poro responsável por prover uma passagem polar, acessível a moléculas de água (FU e LU, 2007). Das posições contrastantes localizadas na alça E, as melhores candidatas a promover alterações funcionais são as posições 569 e 570 (tabela 4), respectivamente a prolina (P) e a alanina (A) do NPA. O motivo NPA possui a importante função de impedir o transporte de prótons que poderia ocorrer em uma coluna de moléculas de água organizadas na mesma orientação (figura 10) (MURATA et al., 2000; DE GROOT e GRUBMÜLLER, 2001; TAJKHORSHID et al., 2002; SAVAGE et al., 2003; FU e LU,

2007). A formação do sítio NPA é dependente de interações hidrofóbicas (van der Waals) promovidas, principalmente pelo resíduo de prolina, para posicionar o grupamento amida do resíduo de asparagina de modo que o nitrogênio interaja com o átomo de oxigênio da molécula de água. Essa interação muda a orientação da molécula de água no centro do canal (figura 10) (MURATA et al., 2000; DE GROOT e GRUBMÜLLER, 2001; TAJKHORSHID et al., 2002; SAVAGE et al., 2003; FU e LU, 2007). Nesse contexto, a leucina na posição 569 do fungo *Aspergillus pombe* apesar de também hidrofóbica, assim como a prolina, não é capaz de formar um anel de imina, o que poderia levar a uma formação não ideal do poro pelos dois motivos NPA. A valina na posição 570 de *Neurospora crassa* mantém a hidrofobicidade da posição, mas a treonina presente em *Drosophila melanogaster* também poderia contribuir para a formação não ideal do poro pelos dois motivos NPA. Particularmente a alanina do motivo NPA parece ser a menos essencial dos três peptídeos visto a existência de outras aquaporinas com motivos NPC (ISHIBASHI, TANAKA e MORISHITA, 2014; FINN e CERDÀ, 2015).

Quantitativamente, de 309,5 resíduos de aminoácidos (média entre todas as sequências de anidrobiontes e não anidrobiontes desta dissertação) 4,2% das posições (13 posições) deixaram de ser conservadas ou diminuíram sua conservação. E mesmo dentre essas 13 posições, mais da metade não se alteram de maneira drástica (367, 372, 432, 434, 464, 573 e 577) a ponto de levar a alterações funcionais e estruturais. Esta análise, conjuntamente com as poucas regiões conservadas em cada grupo (~15% para cada grupo) e a falta de estudos funcionais na literatura envolvendo aquaporinas e anidrobiose sugerem que estas proteínas não diferem em estrutura e funcionalidade entre os grupos. Não suportando, portanto, nossa hipótese de que proteínas aquaporinas de anidrobiontes possuem diferenças em sua estrutura primária quando comparadas a proteínas aquaporinas de não anidrobiontes.

6.2.3 ESTs de *P. superbus*

Uma vez que o banco de dados genéticos do nematoide *Panagrolaimus superbus* se limita a etiquetas de sequências expressas (ESTs ou *expressed sequence tag*) e este não possui anotação da sequência, isto é, não se sabe a real identidade da sequência, torna-se pertinente analisar os ESTs que resultaram do tBlastn®.

A primeira análise avaliou se a estrutura secundária destes ESTs poderia gerar microRNAs (figura 27). MicroRNAs são pequenos RNAs não codificadores de proteínas,

de ~22 nucleotídeos de comprimento, envolvidos em uma via de regulação pós-transcricional da expressão gênica denominada interferência por RNA (RNAi) (LEE e AMBROS, 2001).

Durante a via canônica de biossíntese de microRNAs (figura 35) a RNA polimerase II sintetiza um transcrito que pode ter de centenas a milhares de nucleotídeos (DENLI et al., 2004; MORLANDO et al., 2008; AXTELL, WESTHOLM e LAI, 2011). Esta molécula de RNA é chamada de pri-miRNA ou microRNA primário. O pri-miRNA é então clivado por uma endonuclease da família da RNase III denominada DROSHA; tal clivagem é dependente de outra proteína denominada DGCR8 (em humanos) e PASHA (em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*). O produto da clivagem por DROSHA é um grampo de RNA chamado de pré-microRNA. A enzima DICER, presente no citoplasma, cliva o pré-microRNA em um RNA dupla fita de 21 pares de bases, sendo que os dois últimos nucleotídeos da extremidade 3' são salientes, isto é, não se pareiam com a fita complementar (ARANTES et al., 2015). Ainda existem vias de biossíntese de microRNAs consideradas não canônicas as quais são independentes do processamento por DROSHA (ARANTES et al., 2015), por exemplo microRNAs originados de íntrons (mirtron). Dado as características das sequências de *P. superbus* disponíveis, isto é, não há dados de sequência de íntrons nos ESTs, não é possível realizar análises dessas vias.

Sabe-se que a estrutura secundária do pri-microRNA é determinante para o processamento pelo complexo DROSHA + DGCR8 (PASHA) (este complexo é denominado *microprocessador*). Uma das características que logo excluiria o EST GW408200.1 (figura 27B) é o comprimento da haste, pri-microRNAs possuem ~35 pares de bases no comprimento da haste (DENLI et al., 2004; MORLANDO et al., 2008; AXTELL, WESTHOLM e LAI, 2011). O EST GW411914.1 (figura 27A) atende este requisito, entretanto, assim como o EST GW408200.1 a estrutura das extremidades 5' e 3' dificultariam a interação com o microprocessador (HELVIK, SNØVE e SAESTROM, 2007; KIM, JEONG e KIM, 2017). Além disso, uma característica mais evidentemente observada no EST GW411914.1 seria o *loop* (alça) (região inferior das figuras 27A e 27B). A estrutura da alça não é muito determinante para o processamento do transcrito, todavia o comprimento da alça interfere na interação com o microprocessador, principalmente com DGCR8 (PASHA) (HELVIK, SNØVE e SAESTROM, 2007; KIM, JEONG e KIM, 2017). Caso DGCR8 (PASHA) não interaja de maneira satisfatória com o pri-microRNA, DROSHA não é capaz de clivar o transcrito.

Figura 35. Biossíntese canônica de microRNAs. A RNA polimerase II transcreve o pri-microRNA o qual é clivado pelo microprocessador. No citoplasma a RNase DICER cliva o pré-microRNA em microRNA funcional. Este por sua vez é carregado na proteína ARGONAUTA formando o complexo RISC (Complexo de silenciamento induzido por RNA) (retirado do livro “Introdução ao mundo dos microRNAs”, Pereira, TC (p.67). Editora da SBG, 2015).

Em relação à regulação dos ESTs desse trabalho, sabe-se que no processo de interferência por RNA (RNAi), os microRNAs atuam no RNA mensageiro maduro, isto é, com as sequências 5' e 3' não traduzidas (PEREIRA et al., 2015). Desse modo, a análise deste trabalho se focou em hibridar (*in silico*) tanto o RNA mensageiro maduro da aquaporina 2 de *C. elegans* quanto os ESTs, e avaliar dois aspectos: (i) mínima energia livre (mfe) da hibridação e (ii) se há sobreposição entre o local da hibridação no RNA mensageiro de *C. elegans* e os dos ESTs.

A fase de leitura negativa, muito provavelmente, torna o EST GW408200.1 um transcrito não codificante, a partir disso a análise de regulação por microRNAs se focou no EST GW411914.1. Todas as sequências reguladoras de microRNAs testadas mostraram valores negativos de mínima energia livre, portanto, teoricamente, são capazes de se ligar a ambos os transcritos testados. O cel-mir-786-5p foi o que apresentou uma menor energia livre mínima (figura 31), sendo o microRNA que mais facilmente se ligaria aos transcritos testados. Já o cel-mir-234-3p (figura 30) foi o único que apresentou alguma sobreposição entre os transcritos de *P. superbus* e *C. elegans*.

A partir disso, as sequências do cel-mir-786-5p e do cel-mir-234-3p poderiam ser selecionadas para testes *in vitro* de regulação de aquaporinas. Bancos de dados de predição de alvos como o TargetScanWorm e o microrna.org não apresentam sequências que regulariam aquaporinas em nematoides.

Os valores de abundância relativa dos transcritos estão em RPKM (*Reads per kilobase million*) para *P. superbus* e *Homo sapiens* e em FPKM (*Fragments per kilobase*

million) para *C. elegans*. Essas escalas são comparáveis, chegando ao ponto de ter o mesmo valor caso o sequenciamento de RNA for *single-tailed end* (leitura de extremidade única) (WEITSCHEK et al., 2015; CONESA et al., 2016). Quando isso ocorre, cada *read* (leitura) no método RPKM é equivalente a um *fragment* (fragmento) para o cálculo do FPKM. Além disso, a normalização da análise nesta dissertação torna os valores comparáveis, independentemente da escala de FPKM ou RPKM.

Assumidas as condições supracitadas, pode se observar que ambos os ESTs de *P. superbis* são menos abundantes que os respectivos transcritos em *C. elegans* e *H. sapiens* (figura 33). Particularmente em *H. sapiens* a aquaporina 3 possui sua abundância variável dependendo do tecido de análise (apêndice L). Em *C. elegans* observa-se que a aquaporina 2 é mais abundante nas primeiras fases larvais (apêndice K). Ainda nesta espécie pode se destacar a expressão na fase alternativa do desenvolvimento *dauer*, na qual a abundância do transcrito é maior que a de Actina-1 (normalizador) (figura 33) (apêndice K).

Durante o desenvolvimento de *C. elegans* (figura 36), caso os primeiros estados larvais (larvas L1 e L2) encontrem-se em condições não favoráveis para a progressão do desenvolvimento, como superpopulação, altas temperaturas e escassez de alimentos, ocorre o desenvolvimento em uma fase alternativa denominada *dauer* (WANG et al., 2009; ERKUT e KURZCHALIA, 2015). A larva *dauer* é a única fase do desenvolvimento de *C. elegans* capaz de entrar em anidrobiose, sendo um modelo para estudos de tolerância a diferentes tipos de estresses (WANG et al., 2009; ERKUT e KURZCHALIA, 2015).

O aumento relativo da expressão de aquaporina 2 na única fase anidrobiótica de *C. elegans* pode indicar que esta aquaporina contribui para a tolerância desta fase. O transcrito da aquaporina 2 de *C. elegans* possui 52% de identidade com o mais provável transcrito do gene da aquaporina de *P. superbis* (EST GW411914.1) (apêndice I.1). Já foi demonstrado que em *P. superbis* o silenciamento deste transcrito diminui a viabilidade da espécie quando submetida ao ensaio de dessecação (EVANGELISTA et al., 2017).

Logo, conjectura-se que aquaporina de organismos extremo tolerantes (como espécies anidrobiontes) seja uma proteína induzível em cenários de estresse.

Contudo, diferentemente de *C. elegans*, não ocorre a indução da expressão de aquaporina após estresse hídrico em *P. superbis* (TYSON et al., 2012). Dado a hipótese de que *P. superbis* sendo um estrategista rápido possui parte da maquinaria responsável

pela entrada em anidrobiose, e portanto tolerante a estresses extremos, constitutivamente expressa, é possível que os valores de abundância relativa obtidos nesta dissertação representam a expressão constitutiva da aquaporina, ou alternativamente, o estresse provocador por Tyson e colaboradores (2012) não foi intenso a ponto de induzir a expressão de aquaporinas.

Figura 36. Ciclo de vida do nematoide *Caenorhabditis elegans*. Fases do desenvolvimento de *C. elegans* em condições normais de laboratório. L1-L4 designam as fases larvais 1 a 4. Caso os primeiros estados larvais (L1/L2) sejam condicionados à fome, superpopulação ou altas temperaturas ocorre o desenvolvimento na fase alternativa *dauer* (Imagem retirada do site wormatlas.org).

Nesta dissertação, o foco de investigação foi a movimentação de moléculas de água com o isótopo estável mais pesado do hidrogênio, o *deutério*, em um organismo anidrobionte. Uma vez verificado, em experimentos pilotos, a não letalidade da exposição, o estudo das proteínas responsáveis por facilitar o transporte de água em membranas biológicas, ou seja, das aquaporinas nesta espécie é uma maneira de tentar explicar e entender esta tolerância. Ademais, visto que a espécie modelo deste trabalho é anidrobiótica e que aquaporinas estão envolvidas no processo de sobrevivência ao estresse hídrico extremo (revisto em TUNNACLIFFE e LAPINSKI, 2003), o estudo comparativo de aquaporinas de anidrobiontes e não anidrobiontes é complementar. Um

estudo funcional da aquaporina de *P. superbis* seria o ideal nesta ocasião, contudo dado os limites presentes nas informações genéticas desta espécie ainda não foi possível realizar tal estudo, sendo uma análise computacional (*in silico*) a melhor maneira encontrada de se realizar o estudo desejado.

7. Conclusões

Conclusões

Com os presentes dados apresentados na presente dissertação, concluímos que:

- Exposição a concentração de 99,9% D₂O não é letal para o nematoide anidrobionte *Panagrolaimus superbus*
- Exposição a concentração de 99,9% D₂O leva a um retardamento do crescimento populacional de *Panagrolaimus superbus* observado após 10 dias
- Exposições crônicas em concentrações de 10% e 40% D₂O levam a um retardamento do crescimento populacional de *Panagrolaimus superbus* observado após 28 dias
- Exposições crônicas de até 15 dias em concentrações de 10% e 40% não levam a uma alteração no desenvolvimento de *Panagrolaimus superbus*
- O EST GW411914.1 (NCBI) de *Panagrolaimus superbus* é o representante da sequência codificadora do gene da aquaporina nesta espécie
- O EST GW408200.1 (NCBI) não é uma sequência codificadora de proteína nesta espécie
- Proteínas aquaporinas de anidrobiontes não diferem em sua estrutura primária de proteínas aquaporinas de não anidrobionte

8. Apêndices

APÊNDICE A. Decaimento β^-

O aspecto chave que determina as propriedades e a natureza de um elemento químico é seu número atômico (Z), definido pelo número de prótons em seu núcleo. O número de massa (A) é a soma de seus prótons e nêutrons.

O isótopo trítio ($Z=1$, $A=3$) pode decair para hélio ($Z=2$, $A=3$) através do decaimento beta negativo (β^- decay). Isto é, um de seus nêutrons decai para um próton, com a emissão de um elétron e um elétron antineutrino.

Nota. Diagrama de Feynman representado o decaimento β^- negativo. Um nêutron (n) decai em próton (p) com a emissão de um bóson W^- que posteriormente decai em um elétron (e^-) e um elétron antineutrino ($\bar{\nu}_e$). Em essência, um quark down (d) decai em quark up (u). t : tempo (Imagem retirada de http://www.wikiwand.com/pt/Part%C3%ADcula_beta).

APÊNDICE B. Micrografia da coloração de vermes após a reidratação para cálculo da viabilidade. Os indivíduos corados são considerados mortos e os não corados vivos.

APÊNDICE C. Micrografia da determinação das etapas do ciclo de vida. 1 px equivale a, aproximadamente, 2 μm .

APÊNDICE D. Número de acesso de sequências biológicas utilizadas.

Espécie	Identidade	Natureza da Sequência	Números de Acesso			
			NCBI	wormbase	NEMBASE4	mirbase
A - <i>Panagrolaimus superbus</i>	Major Intrinsic Protein	EST	GW411914.1	-	PSC01029	-
A - <i>Panagrolaimus superbus</i>	Major Intrinsic Protein	EST	GW408200.1	-	PSC01205	-
A - <i>Panagrolaimus superbus</i>	Actin	EST	GW409906.1	-	PSC00457	-
A - <i>Panagrolaimus superbus</i>	40S Ribosomal ptn S2	EST	GW408938.1	-	PSC02975	-
A - <i>Panagrolaimus superbus</i>	Histona H3	EST	GW407989.1	-	PSC00363	-
A - <i>Panagrolaimus superbus</i>	Histona H3	EST	GW406999.1	-	PSC02234	-
A - <i>Panagrolaimus superbus</i>	Histona H3	EST	GW411817.1	-	PSC00196	-
A - <i>Panagrolaimus superbus</i>	GPD-3	EST	GW410829.1	-	PSC01471	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-1a	RNA	NM_063109.5	WBGene00000169	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-1a	Proteína	NP_495510.1		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-2a	RNA	NM_063571.4	WBGene00000170	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-2a	Proteína	NP_495972.1		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-3a	RNA	NM_069643.1	WBGene00000171	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-3a	Proteína	NP_502044.1		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-4	RNA	NM_073111.5	WBGene00000172	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-4	Proteína	NP_505512.3		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-5	RNA	NM_073290.2	WBGene00000173	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-5	Proteína	NP_505691.2		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-6a	RNA	NM_001269317.1	WBGene00000174	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-6a	Proteína	NP_001256248.1		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-7	RNA	NM_076114.4	WBGene00000175	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-7	Proteína	NP_508515.2		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-8b	RNA	NM_001029587.2	WBGene00000176	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-8b	Proteína	NP_001024758.1		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-9a	RNA	NM_001264219.1	WBGene00000177	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-9a	Proteína	NP_001251148.1		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-10	RNA	NM_063704.5	WBGene00000178	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-10	Proteína	NP_496105.1		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-11	RNA	NM_067420.5	WBGene00000179	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-11	Proteína	NP_499821.2		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	aqp-12	RNA	NM_001027309.1	WBGene00013272	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	AQP-12	Proteína	NP_001022480.1		-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	Actin-1	Proteína	NP_505819.1	WBGene00000063	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	40S Ribosomal ptn S2	Proteína	NP_501322.1	WBGene00004471	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	Histona H3	Proteína	NP_496899.1	WBGene00001916	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	GPD-3	Proteína	NP_508534.3	WBGene00001685	-	-
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	cel-mir-50-5p	RNA	-	-	-	MIMAT0000021
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	cel-mir-234-5p	RNA	-	-	-	MIMAT0020330
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	cel-mir-234-3p	RNA	-	-	-	MIMAT0000289
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	cel-mir-786-5p	RNA	-	-	-	MIMAT0015239
A - <i>Caenorhabditis elegans</i>	cel-mir-8203-3p	RNA	-	-	-	MIMAT0032820
A - <i>Ramazzottius varieornatus</i>	AQP-5	Proteína	GAU88233.1	-	-	-
A - <i>Polypedilum vanderplanki</i>	AQP	Proteína	BAF62091.1	-	-	-
A - <i>Hypsibius dujardini</i>	aqp-9	Proteína	OQV13434.1	-	-	-
A - <i>Drosocera hygroscopicum</i>	hypothetical protein	Proteína	KZV35100.1	-	-	-
A - <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	MipK	Proteína	AAD31848.1	-	-	-
A - <i>Schizobium commune</i> H4-8	hypothetical protein	Proteína	XP_003032759.1	-	-	-
A - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AQP-3	Proteína	ONH71593.1	-	-	-
A - <i>Deinococcus radiodurans</i>	aquaporin family protein	Proteína	WP_010888564.1	-	-	-
A - <i>Listeria</i>	aquaporin family protein	Proteína	WP_003766525.1	-	-	-
A - <i>Clostridium sporogenes</i>	aquaporin family protein	Proteína	WP_045904422.1	-	-	-
N - <i>Homo sapiens</i>	aqp-3	DNA	360	-	-	-
N - <i>Homo sapiens</i>	AQP-3 isoform 1	Proteína	NP_004916.1	-	-	-
N - <i>Homo sapiens</i>	GAPDH	DNA	2597	-	-	-
N - <i>Homo sapiens</i>	Actin Beta	DNA	60	-	-	-
N - <i>Homo sapiens</i>	Histone H3	DNA	1269691	-	-	-
N - <i>Homo sapiens</i>	Ribosomal Protein S2	DNA	6187	-	-	-
N - <i>Rattus norvegicus</i>	AQP-3	Proteína	NP_113891.1	-	-	-
N - <i>Mus musculus</i>	AQP-3	Proteína	NP_057898.2	-	-	-
N - <i>Xenopus laevis</i>	AQP	Proteína	NP_001082310.1	-	-	-
N - <i>Danio rerio</i>	AQP-9a	Proteína	NP_001028268.1	-	-	-
N - <i>Drosophila melanogaster</i>	entomoglyceroporin 3	Proteína	NP_611812.2	-	-	-
N - <i>Arabidopsis thaliana</i>	plasma membrane intrinsic protein 2b	Proteína	CAA53478.1	-	-	-
N - <i>Arabidopsis thaliana</i>	plasma membrane intrinsic protein 2E	Proteína	NP_181434.1	-	-	-
N - <i>Nicotiana tabacum</i>	aquaporin PIP2-7-like	Proteína	XP_016476355.1	-	-	-
N - <i>Zea mays</i>	aquaporin PIP2-7	Proteína	Q9ATM4.1	-	-	-
N - <i>Neurospora crassa</i>	aquaporin	Proteína	XP_965183.2	-	-	-
N - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	MIP water channel	Proteína	NP_592788.1	-	-	-
N - <i>Aspergillus bombycis</i>	aquaglyceroporin	Proteína	XP_022394193.1	-	-	-
N - <i>Escherichia coli</i>	aquaporin	Proteína	WP_086589392.1	-	-	-
N - <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	aquaporin Z	Proteína	WP_003519943.1	-	-	-
N - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	GfP	Proteína	CNG76465.1	-	-	-

Nota. As espécies com ‘A’ são anidrobiontes e as espécies com ‘N’ não são anidrobiontes.

APÊNDICE F. Estruturas tridimensionais da aquaporina 2, isoforma a do nematoide *Caenorhabditis elegans* (A e C) e da aquaporina 3, isoforma 1 da espécie humana (B e D). As predições tridimensionais foram realizadas no servidor I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). A sobreposição de ambas proteínas (*C. elegans* em verde e *H. sapiens* em vermelho) (E e F) foi realizada no software PyMOL (<https://pymol.org/2/>).

Nota: Os motivos NPA de cada proteína estão destacados em azul

APÊNDICE G. Análise dos microRNAs candidatos com o EST GW408200.1

G.1 Cel-mir-50-5p (A) hibridação com o EST GW408200.1. representado pela sigla ‘Psuperbus-1-2’ (B) hibridação com RNA mensageiro da aquaporina 2 de *C. elegans*. (C) Locais de hibridação no alinhamento entre as sequências, em amarelo a hibridação no RNA mensageiro e em verde a hibridação no EST. Os retângulos vermelhos destacam o valor de *mfe* (*minimum free energy* ou energia livre mínima), quanto menor o valor maior a probabilidade da estrutura se formar.

A	B
<p>Version: RNAhybrid 2.2</p> <p>searching dataset: 1 mfe of cel-mir-50-5p: -47.200001 Individual hits</p> <hr/> <p>dataset: 1 Target: Psuperbus-1-2 length: 493 MiRNA: cel-mir-50-5p length: 24</p> <p>mfe: -20.7 kcal/mol p-value: 1.000000e+00</p> <p>Position: 151 target 5' U A CA UUAUAUA A 3' ACC AAGG AUACC AUAUCA UGG UUCU UAUGG UADAGU miRNA 3' U G UCUG 5'</p>	<p>Version: RNAhybrid 2.2</p> <p>searching dataset: 1 mfe of cel-mir-50-5p: -47.200001 Individual hits</p> <hr/> <p>dataset: 1 Target: RNAmCeAP2 length: 1204 MiRNA: cel-mir-50-5p length: 24</p> <p>mfe: -23.3 kcal/mol p-value: 1.000000e+00</p> <p>Position: 454 target 5' U CUCCAC UC U A 3' ACCCAG ACC GGAC UGUCA UGGGUU UGG UCUG AUAGU miRNA 3' U CUUA U 5'</p>
<p>PsuperbusEG RNAmCeAPQ2</p> <p>PsuperbusEG RNAmCeAPQ2</p> <p>PsuperbusEG RNAmCeAPQ2</p> <p>PsuperbusEG RNAmCeAPQ2</p> <p>PsuperbusEG RNAmCeAPQ2</p> <p>PsuperbusEG RNAmCeAPQ2</p> <p>PsuperbusEG RNAmCeAPQ2</p>	<p>GGACCAAGGACACCGCCGAATCTTCGCTCTTACCCAGCTCCACACTCGGACTTGTG</p> <p>-----GGGGGATTAAATAATATTATTTTTTTTGTITIT----- AACGGATTGTGATCAATTCGTGCGCCACGCGTITTCGTCTTCTGATCGTCAATC * * * * *</p> <p>GTGACAAAGCGCAACTCTTACCAACATGGCTTACCCAATCCTTGTGGAACCGGATTC</p> <p>GTGCGCATCGGAGCGCTTCGGATACAACTGCGGATACCCAGTCAACCCAGCTCGTGAC</p> <p>TTTGACCACGTCTCTTCACTCCATCTTCTACGGAGAGCTGTCTTCAACAGTGGTTC</p> <p>-----ACCTGTGCAA---CATGTAT--GC----- TGGGTTCCAAITGTTGGACATTCGTGCGAGCTGTGCTGGAATCTGGCTTTACTACTTC * * * * *</p> <p>---AATAGCTTTGATGGGACGAATGGCGCCAGAAACAGG-----AAGGCAAGGGTGAC TTGATTGGATTCCACTCCACAAGACGCTGAGGAGAAGTACGTCTACTACCGGAAAC * * * * *</p> <p>AGCAGGATTAAATGTCCACCAATTAATTAATACATAATGCAATACCAAGGCATACG CAGGAGCTCAAGCCACTCACCAGCAAGAACTG-TGATGAAGAGCCGCTTAACGAT * * * * *</p> <p>TTGAATGATTCGATGCTTTAATTA-----CITTTATTTAGTAATTATAAGGTCA tcgacccaatttcgaatgctagcagctcgctccaaactttcttctcggaatctcglat * * * * *</p>

G.2 Cel-mir-234-5p (A) hibridação com o EST GW408200.1. representado pela sigla ‘Psuperbus-1-2’ (B) hibridação com RNA mensageiro da aquaporina 2 de *C. elegans*. (C) Locais de hibridação no alinhamento entre as sequências, em amarelo a hibridação no RNA mensageiro e em verde a hibridação no EST. Os retângulos vermelhos destacam o valor de *mfe* (*minimum free energy* ou energia livre mínima), quanto menor o valor maior a probabilidade da estrutura se formar.

G.3 Cel-mir-234-3p (A) hibridação com o EST GW408200.1. representado pela sigla ‘Psuperbus-1-2’ (B) hibridação com RNA mensageiro da aquaporina 2 de *C. elegans*. (C) Locais de hibridação no alinhamento entre as sequências, em amarelo a hibridação no RNA mensageiro e em verde a hibridação no EST. Os retângulos vermelhos destacam o valor de *mfe* (*minimum free energy* ou energia livre mínima), quanto menor o valor maior a probabilidade da estrutura se formar.

Version: RNAhybrid 2.2

A

searching
dataset: 1
mfe of cel-mir-234-3p: -40.900002
Individual hits

dataset: 1
Target: Psuperbus-1-2
length: 493
MiRNA: cel-mir-234-3p
length: 21
mfe: -17.8 kcal/mol
p-value: 1.000000e+00

Position: 276
target 5' U AAGAACA C 3'
AGG UUUUGAGCAA
UCC AGAGCUCGUU
miRNA 3' U CAUA AUU 5'

Version: RNAhybrid 2.2

B

searching
dataset: 1
mfe of cel-mir-234-3p: -40.900002
Individual hits

dataset: 1
Target: RNAmCeAP2
length: 1204
MiRNA: cel-mir-234-3p
length: 21
mfe: -17.5 kcal/mol
p-value: 1.000000e+00

Position: 721
target 5' U UCCAAUUGUUGACC G G U 3'
GGGU AUUC UC GAGC
CCCA UAAG AG CUCG
miRNA 3' UU UUAUU 5'

PsuperbusPG
RNAmCeAPQ2
TGGGTTCCAATTGTTGGACCATTCGTCGGAGCTGTCSTCGGATCTGGCTTTACTACTTC

PsuperbusPG
RNAmCeAPQ2
---AATAGCTTTGATGGGACGAATGGCGCCAAGAACAGG-----AAGGCAGGGTGAC
TTGATTGGATTCCACACTCCACAAGACGCTGAGGAGAAGTACGTCGTAACCCGGAAC

PsuperbusPG
RNAmCeAPQ2
AGCAGGATTAAATATGCCACCACTAATCTAATACATAATGCAATACCAAGGCAATACC
CAGGAGCTCAAGCCACTCACGCAAGGAAACTG-TCGATGAAGAAGCCGCTAAacgat

PsuperbusPG
RNAmCeAPQ2
TTAAATAATATCAAATGCTTTAATTA-----CTTTTATTTAGTAATTATAAGGTCA
tcgaccaatattcaatgctaccatcctgctccaaactttctttctgctatcgtat

PsuperbusPG
RNAmCeAPQ2
ACATACCAC-----ATGCAACACCAACATTACCAATGAGGGCATTTCCTAA-TCCAGC
aaatgaaaaacataaaaaaatcgaaaatcacaaaaattgataattttctagctttcga

PsuperbusPG
RNAmCeAPQ2
TTACGACAAACATTTGACAAACACAGATGTAATAATAAGAACTAAACTAAAGTTC-
ccccgaaatcctttctcacctgatcaaac-----aaaaacaaatattt

C

G.4 Cel-mir-786-5p (A) hibridação com o EST GW408200.1. representado pela sigla ‘Psuperbus-1-2’ (B) hibridação com RNA mensageiro da aquaporina 2 de *C. elegans*. (C) Locais de hibridação no alinhamento entre as sequências, em amarelo a hibridação no RNA mensageiro e em verde a hibridação no EST. Os retângulos vermelhos destacam o valor de *mfe* (*minimum free energy* ou energia livre mínima), quanto menor o valor maior a probabilidade da estrutura se formar.

G.5 Cel-mir-8203-3p (A) hibridação com o EST GW408200.1. representado pela sigla ‘Psuperbus-1-2’ (B) hibridação com RNA mensageiro da aquaporina 2 de *C. elegans*. (C) Locais de hibridação no alinhamento entre as sequências, em amarelo a hibridação no RNA mensageiro e em verde a hibridação no EST. Os retângulos vermelhos destacam o valor de *mfe* (*minimum free energy* ou energia livre mínima), quanto menor o valor maior a probabilidade da estrutura se formar.

[illegible]

APÊNDICE H. Alinhamentos entre as sequências dos ESTs com a região codificadora da aquaporina 2 de *C. elegans* e entre os ESTs,

H.1 Alinhamento entre o EST GW411914.1 representado pela sigla ‘Psuperbus+3’ e a região codificadora da aquaporina 2 de *C. elegans* representada pela sigla ‘CDSAqp2Ce’. A identidade entre as sequências foi de 52%. As setas indicam os limites entre os éxons da aquaporina 2 de *C. elegans*. ‘*’ significa posição conservada entre as sequências.

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

ATGATCTTGGACAACTTCGCGCCAAGTTCACCAITTCGTAAGAGATTGCTCCGCGCTGIG
-----GG *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

CTCGCTGAGTTCACCGAACTTACTTGTCTGTCTCATCGGACTTCTGTTGTGCACAG
GTAGCTGAATTCCTTGGAACTTTAGTTTTAGTCTTATTATTACATCTGTTGTTGCTCAA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

AAGGTGTGCGCAAGAC---CAGAAGTCAACGAATTCATTGGAGTCAACGTCGGATTTCGGA
AATGTTCTTCTCTAAAGCTGGATTAGGAAATGCCCTCATTGGTGTAAATGTTGGTGTGCA
** *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

ATCGCCATCGTTTTTCGTTGTTGCTGTCTGTGCAAACTCTCCGGAGGACATATTAACCTT
TGTGGTATTGCCTTTGGTATTGCATTATGTATTAGAATTAGTGGTGGACATATTAATCTCT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

GCGGTCTCCTTTGCCTTCTTTCCGTCGGACAAATCACCATCGTCCAATTCATTGCCTAC
GCTGTCAACCTTGCCTTCTTTGTTCTTGGCGCCATTGCTCCCTCAAAGCTATTGCATAC
** *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

TTCTGTCGCCAATTCCTCGGAGCTTTCTTCGGAGCCGCCACCGTCTACGCCGTCTACAAT
ATGTTTGCACAGGTTGCTGGAGCCTTTGTTGGAGCAATGTTGACCTATTCTTTACAAT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

GACGCCATCAATGTGTTTGACGGAGGAGTTCGTACCGTTGGAGGACCAAGGACACCGCC
GATGCCATCAATGTCTTTGATGCAGGAACCGTCGAGTTGAAGCCCTTAAAGCTACTGCA
** *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

GGAATCTTCGCCTCTTACCCAGCTCCACACCTCGGACTTGTCAACGGATTGTGCGATCAA
CACATCTTTGCATCATATCCTGGTGCACATCTGGATGGGCTGGTGGTCTTTTGTATCAA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

TTCTGTCGCCACCGCGGTTTTCTGTTCTTCTGATCGCTCACATCGTCGACAAAGCGCAACTCT
ATTATCGGCACATGCAGTCTTCGTTCTTATCATTTGTTCAIACCGTTGATCGTCGAAATGCT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

TACCCAACATGGCTTCAGCCAATCCTTGTGCGAACCGGATTGTCGCCATCGGAGCCGCC
TATCCAATGTGGGTTTCGTCCATTATCATGGGGGTTGGATTCTTATGATTGGTACCGCC
** *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

TTCGGATACAACATGCGGATACCCAGTCAACCCAGCTCGTGACTTTGCACCACGTCTCTTC
TCTGCTTTCAATGCTGGATAATCACTTAATCTGACGTGACTTTGGACCACGTCTTTT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

ACCTCCATCTTCTACGGAGGAGCTGTCTTAC-----CAAGTGGTTCTGG
ACCTTGTGTTGGGCTGGGGAAGCAAAACATTCTCTTCAATGATTTCGGATGGTCTGG
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

GTTCCAATTGTTGGACCATTCGTCGGAGCTGTGTCGGAATCTGGCTTTACTACTTCTTG
ATCCCAATTGTTGGCCCCCTATTGTTGGTGTCTTGGAGCTCTTGCCCTA-----
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

ATTGGATTCCACACTCCACAAGACGCTGAGGAGAAGTACGTCGTACTCACCGGAAACCAG

CDS Aqp2Ce
Psuperbus+3

GAGCTCAAGCCACTCACCGCAAGGAACTGTCGATGAAGAAGCCGCTTAA

H.2 Alinhamento entre o EST GW408200.1 representado pela sigla ‘PsuperbusPG’ e a região codificadora da aquaporina 2 de *C. elegans* representada pela sigla ‘CDSAqp2Ce’. A identidade entre as sequências foi de 39%. As setas indicam os limites entre os éxons da aquaporina 2 de *C. elegans*. ‘*’ significa posição conservada entre as sequências.

```

CDSAqp2Ce      ATGATCTTGGACAACTTCGCGCCAAGTTCACATTTCGTAAAGAGTTGCTCCGCGCTGTG
PsuperbusPG    -----

CDSAqp2Ce      CTCGCTGAGTTCACCGGAAGTTACTTGTCTGTCTCATCGGACTTTCTGTTGTGCGCACAG
PsuperbusPG    ---GGGGGATTAAATAATATTTATTTTTTTTTTGT-----TTACCTGTGCAACATGT
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CDSAqp2Ce      AAGGTGT----TGCCAAGACCAGAAGTCAACGAATTTCATTGGAGTCAACGTCGGATTTCGG
PsuperbusPG    ATGCAATAGCTTTGATGGGACGAATGGCGCCAGAA+CAAGGAAGGCBAGGGTGCACAGCAG
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CDSAqp2Ce      AATCGCCATCGTTTTCGGTGTTGCTGT---CTCTGCCAACTCTCCGGAGGACATATTAA
PsuperbusPG    GATTAATATGTCCACCACTAATTCTAATACATAATGCAATACCAAGGCAATACCTTAAA
      **  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CDSAqp2Ce      CCCTGCGGTCTCCTTTGCCTTCCTTTCCGTGCGACAAATCACCATCGTCCAATTCATTGC
PsuperbusPG    TAATATCAAATGCTTTAATTACTTTTATTTTCAGTAATTATA-----
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CDSAqp2Ce      CTACTTCGTGCCCCAATTCTTCGGAGCTTTCTTCGGAGCCGCCACCGTCTACGCCGTCTA
PsuperbusPG    -----AGGTCAACATACCACATGCAACACCAA
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CDSAqp2Ce      CAATGACGCCATCAATGTGTTTGACGGAGGAGTTCGTACCGTTGGAGGACCAAGGACAC
PsuperbusPG    CATT-----
      **  *

CDSAqp2Ce      CGCCGGAATCTTCGCCTCTTACCCAGCTCCACACCTCGGACTTGTCAACGGATTGTGCA
PsuperbusPG    -----

CDSAqp2Ce      TCAATTCGTGCCCACCGCCGTTTTTCGTCTTCTGATCGCTCACATCGTCGACAAGCGCAA
PsuperbusPG    -----

CDSAqp2Ce      CTCTTACCCAACATGGCTTCAGCCAATCCTTGT--CGGAACCGGATTTCGTGCCCATCGGA
PsuperbusPG    --TACACCAATGAGGGCATTTCCTAATCCAGCTTTAGGAAGAATTTTGTAGCAACAACA
      ***  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CDSAqp2Ce      CTCTTACCCAACATGGCTTCAGCCAATCCTTGT--CGGAACCGGATTTCGTGCCCATCGGA
PsuperbusPG    --TACACCAATGAGGGCATTTCCTAATCCAGCTTTAGGAAGAATTTTGTAGCAACAACA
      ***  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CDSAqp2Ce      GCC---GCCTTCGGATACAAGTTCGGATACCCAGTCAACCCAGCTCGTGACTTTGCACCA
PsuperbusPG    GATGTAATAATAAGAACTAAAGTTTCAAAGAATTTCAGCTAAAGCTGTTTCGGCCA
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CDSAqp2Ce      CGTCTCTTCACCTCCATCTTCTACGGAGGAGCTGTCT--TCACCAAGTGGTTCTGG--GT
PsuperbusPG    -----ATATCATGCTTCAAAGTTGCCTTTACACGAACTCGATCAACCCAT
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CDSAqp2Ce      TCCAATTGTTGGACCATTCGTGCGGAGCTGTGTCGGAATCTGGCTTTACTACTTCTTGAT
PsuperbusPG    GTAACCTGTTCCACCAT-----GGTTCCTTAACACTTACTTGCTTGTCTTCTTGAG
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CDSAqp2Ce      TGGATTCCCACTCCACAAGACGCTGAGGAGAAGTACGTCGTACTCACCGGAAACCAGGA
PsuperbusPG    TATTTTCAAAGCAAAAA--ATGGAAGGAGGTTTACG-----
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CDSAqp2Ce      GCTCAAGCCACTCACCGCCAAGGAACTGTGATGAAGAAGCCGCCTAA
PsuperbusPG    -----

```

H.3 Alinhamento entre o EST GW411914.1 representado pela sigla ‘Psuperbus+3’ e o EST GW408200.1 representado pela sigla ‘PsuperbusPG’. A identidade entre as sequências foi de 44%. ‘*’ significa posição conservada entre as sequências.

```

PsuperbusAQP      GGGTAGCTGAATTCTTTGGAACCTTAGTTTGGTTCTTATTATTACATCTGTTGTTGCTC
PsuperbusPG      -----GGGGGATTAAATAATATTATTTTTTTTTTGTGTTTACC-TGTGC
                      **  * * * * * * * * * * * * * * * *

PsuperbusAQP      AAAATGTTCTTCTTAAGCTGGATTAG--GAAATGCCCTCATTGGTGTAATGTTGGTGT
PsuperbusPG      -AAACATGTATGCAATAGCTTTGATGGGACGAATGGCGCCAAGAACAAGGAAGGCAAGG
                      ***  *  * * * * * * * * * * * * * * *

PsuperbusAQP      TGCATGTGGTATTGCCTTTGGTATTGCATTATGTATTAGAATTAGTGGTGGACATATTAA
PsuperbusPG      TGACAGCAGGATTA-----ATATG-----
                      **  *  * * * * * * *

PsuperbusAQP      TCCTGCTGTCACCCCTTGCTTCTTGTCTTGGCGCCATTGTCCTCCCTCAAAGCTATTGC
PsuperbusPG      -----TCCACCACTAATTCTAATACATAATGCAATACCAAAGGCAATACC
                      *  *  * * * * * * * * * * * * * * *

PsuperbusAQP      ATACATGTTTGCACAGGTTGCTGGAGCCTTTGTTGGAGCAATGTTGACCTATTTCCTTTA
PsuperbusPG      TTAAATAATATCAAATGCTTTAATTACTTTTATTTCAGTAATTATA-----
                      ** * *  * * * * * * * * * * * * *

PsuperbusAQP      CAATGATGCCATCAATGTCTTTGATGCAGGAACCGTCGAGTTGAAGGCCTTAAAGCTAC
PsuperbusPG      -----A---GGTCAACATACCACATGCAA---CACCA-----ACATTACACCAA
                      *  * * * * * * * * * * * * * * * *

PsuperbusAQP      TGCACACATCTTTGCATCATACTCTGGTGCACATCTTGGATGGGCTGG---TGGTCTTTT
PsuperbusPG      TGAG-----GGCATTTCCTAATCCAGCTTTAGGAAGAACAATTTGAGCAACAAC
                      **  * * * * * * * * * * * * * * * *

PsuperbusAQP      TGATCAAATTATCGGCACTGCAGTCTTCGTTCTTATCATTGTTCATACCGTTGATCGTCG
PsuperbusPG      AGATGTAATAATAAGAACTAAACTAAAGTTCCAAAGAATTGAGTAAAGCTGTTTCGGCC
                      ***  *** * * * * * * * * * * * * * * *

PsuperbusAQP      AA-ATGCTTATCCAATGTGGGTTCTGTCATTTCATCATGGGGTTGGATTCTTATGATTG
PsuperbusPG      AATATCATGCTTCAAAGT-----TGCCTTTACACGAACCTC
                      ** * *  * * * * * * * * * * * * *

PsuperbusAQP      GTACCGCCTCTGCTTTCAATGCTGGATACTCACTTAATCTGCACGTGACTTTGGACCAC
PsuperbusPG      GATCAA-----CCCATGTAAGTTGTTCCACCAATGTTCTTCTAA-CAC
                      *  *  * * * * * * * * * * * * * * *

PsuperbusAQP      GTCITTTTACCCTTGTTTGGGG-CTGGGGAAGCAAAACATTCTCTTTCAATGATTTCGGA
PsuperbusPG      TTACTTGCTTGCTTCTTGAGTATTTTCAAAGCAAAAATGG---AAAAAAGGTTTACG-
                      *  **  * * * * * * * * * * * * * * *

PsuperbusAQP      TGGTCTGGATCCCAATTGTTGGCCCCCTATTGGTGGTGTCTTGGAGCTCTTGCCTA
PsuperbusPG      -----

```

APÊNDICE I. Abundância de ESTs de actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, proteína ribossomal S2 da subunidade 40S e dos ESTs GW411914.1 e GW408200.1 de *P. superbus* em RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) calculada da maneira descrita no item 4.9.6.

APÊNDICE J. Abundância dos transcritos de actina (WBGene000000063) (wormbase), aquaporina 2 (WBGene00000170) (wormbase), proteína ribossomal S2 da subunidade 40S (WBGene00004471) (wormbase) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (WBGene00001685) (wormbase) para cada fase do ciclo de vida de *C. elegans*. Os valores estão em FPKM (*Fragments Per Kilobase Million*) e obtidos no banco de dados www.wormbase.org.

Nota. Valores de RPKM e FPKM são muito próximos e em condições específicas (como mapeamento de leituras emparelhadas) podem ser idênticos (WEITSCHKE, 2015).

APÊNDICE K. Abundância dos transcritos de actina (GeneBank ID 60) (NCBI), aquaporina 3 (GeneBank ID 360) (NCBI), proteína ribossomal S2 (GeneBank ID 6187) (NCBI) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GeneBank ID 2597) em diferentes tecido de *Homo sapiens*. Os valores estão em RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) e foram obtidos no NCBI.

Glossário

- Blastn (*nucleotide Blast*): Blast baseado em alinhamento entre sequências nucleotídicas (pag 42)
- Blastp (*protein Blast*): Blast baseado em alinhamento entre sequências proteicas (pag 51)
- Blastx: Pesquisa de proteínas utilizando sequências traduzidas de nucleotídeos (pag 38, 41)
- tBlastn: Pesquisa de nucleotídeos traduzidos a partir de uma sequência proteica (pag 38, 43, 51, 53, 79)

Referências Bibliográficas

AGRE, P., PRESTON, G. M., SMITH, B. L., JUNG, J. S., RAINA, S., MOON, C., GUGGINO, W. B., NIELSEN, S. **Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel.** *Am. J. Physiol*, 265: F463-F476, 1993.

AGRE, P., SASAKI, S., CHRISPEELS, M. J. **Aquaporins: a family of water channel proteins.** *Am. J. Physiol*, 265(3): F461

AHMADPOUR, D., GEIJER, C., TAMÁS, M. J., LINDKVIST-PETERSSON, K., HOHMANN, S. **Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(5): 1482-91, 2014

ALCOCK, R., COTTINGHAM, M. G., ROLLIZER, C. S., FURZE, J., DE COSTA, S. D., HANLON, M., SPENCER, A. J., HONEYCUTT, J. D., WYLLIE, D. H., GILBERT, S. C., BREGU, M., HILL, A. D. V. S. **Long-Term Thermostabilization of Live Poxviral and Adenoviral Vaccine Vectors at Supraphysiological Temperatures in Carbohydrate Glass.** *Sci. Transl. Med.* 2(19): 19ra12.

ARANTES, I. L. G., VASLIN, M. F. S., CORRÊA, C. A. P., PEREIRA, T. C., CORRÊA, R. L. **Regulação da abundância de miRNAs.** Em *Introdução ao mundo dos microRNAs* (Org Pereira, T. C.), Cap 3, Ed SBG, p. 65-89, 2015

AXTELL, M. J., WESTHOLM, J. O., LAI, E. C. **Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals.** *Genome Biology*, 12: 221-234, 2011

BECQUEREL, P. **La suspension de la vie au dessous de 1/20 K absolu par demagnetization adiabatique de l'alun de fer dans le vide les plus élevé.** *C. R. Hebd. Séance. Acad. Sci. Paris.* 231: 26, 1950.

BROWN, D. **The Discovery of Water Channels (Aquaporins).** *Annals of Nutrition and Metabolism*, 70(1): 37-42, 2017

BURKE, M. J. **The vitrous state and survival of anhydrous biological systems.** In *Membranes, metabolismo and dry organisms*. Ed A. C. Leopold. Ithaca, NY: Cornell University, pp. 358-364, 1986.

CAMPBELL, E. M., BALL, A., HOPPLER, S., BOWMAN, A. S., **Invertebrate aquaporins: a review.** *J. Comp. Physiol. B*, 178: 935-955, 2008.

CHAPLIN, M. F. **Water: it's important to life.** *Biochemistry and Molecular Biology Education*, (29) pp 54-59, 2001

CHELLGREN, B. W.; CREAMER, T. P. **Effects of H₂O and D₂O on Polypyrrolone II Helical Structure.** *Journal of American Chemistry Society*, 126, p. 14734-14734, 2004.

CLEGG, J. S. **Metabolic studies of cryptobiosis in encysted embryos of *Artemia franciscana*.** *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 20: 801-809, 1967

CLEGG, J. S. **Biochemical adaptations associated with the embryonic dormancy of *Artemia salina*.** *Trans. Am. Microsc. Soc.* 93: 481-490, 1974.

CLEGG, J. S. **Hydration dependent metabolic transitions and the state of water in *Artemia* cysts.** In *Dry biological systems* (ed. J. H. Crowe e J. S. Clegg). *New York: Academic.* 117-154, 1978.

CLEGG, J. S., SEITZ, P., SEITZ, W., HAZLEWOOD, C. F. **Cellular responses to extreme water loss: The water-replacement hypothesis.** *Cryobiology*, 19(3): 306-316, 1982.

CLEGG, J. S. **The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents: the 'water-replacement hypothesis'.** Em *Membranes, metabolism and dry organisms* (ed A. C. Leopold), pp 169-187. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1986.

CLEGG, J. S. **Cryptobiosis: a peculiar state of biological organization.** *Comp. Biochem. Physiol.* 128B, 613–624, 2001.

CLELAND, W. W. **The use of isotope effects to determine enzyme mechanisms,** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433, p. 2-12, 2005.

CONESA, A., MADRIGAL, P., TARAZONA, S., GOMEZ-CABRERO, D., CERVERA, A., MCPHERSON, A., SZCZESNIAK, M. W., GAFFNEY, D., ELO, L. L., ZHANG, X., MORTAZAVI, A. **A survey of best practices for RNA-seq data analysis.** *Genome Biology*, 17: 13-32, 2006

COPPER, A. F., VAN GUNDY, S. D. **Senescence, quiescence, and cryptobiosis.** In *Plant parasitic nematodes.* (ed. B. M. Zuckerman, W. F. Mai, & R. A. Rohde). *New York. Academic Press.* 2: 297-318, 1971.

CROWE, J. H. **Anhydrobiosis: an unsolved problem.** *Am. Nat.* 105: 563-573, 1971.

CROWE, J. H., HOEKSTRA, F. A., CROWE, L. M. **Anhydrobiosis.** *A. Rev. Physiol.* 54: 579–599, 1992.

CROWE, J. H., CARPENTER, J. F., CROWE, L. M. **The role of vitrification in anhydrobiosis.** *Annu. Rev. Physiol.* 60: 73-103, 1998.

DENLI, A. M., TOPS, B. B. J., PLASTERK, R. H. A., KETTING, R. F., HANNON, G. J. **Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.** *Nature*, 432: 231-235, 2004

DENKER, B. M., SMITH, B. L., KUHADJA, F. P., AGRE, P. **Identification, Purification, and Partial Characterization of a Novel Mr 28,000 Integral Membrane Protein from Erythrocytes and Renal Rubens.** *The Journal of Biological Chemistry*, 263(30): 15634-42, 1988.

DE CARLI, G. J. **Efeitos biológicos e bioquímicos do óxido de deutério e seu possível impacto na anidrobiose.** 2015. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

DE GROOT, B. L., GRUBMÜLLER, H. **Water Permeation Across Biological Membranes: Mechanism and Dynamics of Aquaporin-1 and GlpF.** *Science*, 294(5550): 2353-2357, 2001

DE LEY, P., BLAXTER, M.L. **Systematic position and phylogeny.** In *The Biology of Nematodes.* (ed. D. Lee). *Harwood Academic Publishers.* 1-30, 2002.

DE SOUZA, T. A. J., DE CARLI, G. J., PEREIRA, T. C. **Survival potencial of the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus* submitted to extreme abiotic stresses.** *Invertebrate Survival Journal*, 14:85-93, 2017

ERKUT, C., KURZCHALIA, T. V. **The *C. elegans* dauer larva as a paradigm to study metabolic suppression and desiccation tolerance.** *Planta*, 242(2): 389-396, 2015

EVANGELISTA, C. C. S. **Estudo da participação de uma peroxiredoxina na via de anidrobiose através de interferência por RNA (RNAi).** 2011. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

EVANGELISTA, C. C. S., GUIDELLI, G. V., BORGES, G., ARAÚJO, T. F., DE SOUZA, T. A. J., NEVES, U. P. C., TUNNACLIFFE, A., PEREIRA, T. C. **Multiple genes contribute to anhydrobiosis (tolerance to extreme desiccation) in the nematode *Panagrolaimus superbus*.** *Gene Molec Biol*, 40(4): 790-802, 2017

- FARRANT, J. M., MOORE, J. P., **Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants.** *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 340-345, 2011
- FARVER, O.; ZHANG, J.; CHI, Q.; PECHT, I.; ULSTRUP, J. **Deuterium Isotope effect on intramolecular electron transfer in *Pseudomonas aeruginosa* azurin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 8, p. 4426-4430, 2001.
- FINN, R. N., CERDÀ, J. **Evolution and Functional Diversity of Aquaporins.** *Biol Bull.*, 229: 6-23, 2015
- FORD, B. J. **The van Leeuwenhoek Specimens.** *Notes and Records of the Royal Society of London*. Vol 36: No 1, pp 37-59, 1981.
- FRANÇA, M. B., PANEK, A. D., ELEUTHERIO, E. C. A. **Oxidative stress and its effects during dehydration.** *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A. 146: 621-631, 2007.
- FU, D., LU, M. **The structural basis of water permeation and proton exclusion in aquaporins.** *Molecular Membrane Biology*, 24(5-6): 366-374, 2007
- GARCIA DE CASTRO, A., TUNNACLIFFE, A. **Intracellular trehalose improves osmotolerance but not desiccation tolerance in mammalian cells.** *FEBS Lett.* 487 (2): 199-202, 2000.
- GARCIA DE CASTRO, A., BREDHOLT, H., STROM, A.R., TUNNACLIFFE, A. **Anhydrobiotic engineering of gram-negative bacteria.** *Appl Environ Microbiol.* 66 (9): 4142-4, 2000.
- GIARD, A. **L'anhydrobiose ou ralentissement des phénomènes vitaux.** *C. R. Soc. Biol. Paris.* 46, 497-500, 1894.
- GORYUNOV, A. S. **H/D Isotope Effects on Protein Hydration and Interaction in Solution.** *General Physiology and Biophysics*, 25, p. 303-311, 2006.
- GUIDELLI, G. V. **Análise dos efeitos do silenciamento de uma glutatona peroxidase no nematóide anidrobiótico *Panagrolaimus superbus*.** 94 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- GUIDETTI, R., JÖNSSON, K. I. **Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans.** *J.Zool.* 257: 181-187, 2002.
- GORIN, M. B., YANCEY, B., CLINE, J., REVEL, J. P., HORWITZ, J. **The Major Intrinsic Protein (MIP) of the Bovine Lens Fiber Membrane: Characterization and Structure Based on cDNA Cloning.** *Cell*, 39: 49-59, 1984.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symp Ser*, 41: 95-98, 1999
- HAMMEL, S. C.; EAST, K.; SHAKA, A. J.; ROSE, M. R.; SHAHRESTANI, P. **Brief Early-Life Non-Specific Incorporation of Deuterium Extends Mean Life Span in *Drosophila melanogaster* Without Affecting Fecundity.** *Rejuvenation Research*, 16, 2, p. 98-104, 2013.
- HAN, J., LEE, Y., YEOM, K. H., NAM, J. W., HEO, I., RHEE, J. K., SOHN, S. Y., CHO, Y., ZHANG, B. T., KIM, V. N. **Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex.** *Cell*, 125: 887-901, 2006
- HARRISON, J. **Doses and risks from tritiated water and environmental organically bound tritium.** *Journal of Radiological Protection*. 29: 335 – 349, 2009.

- HELVIK, S. A., SNØVE, O., SÆSTRON, P. **Reliable prediction of Drosha processing sites improves microRNA gene prediction.** *Bioinformatics*, 23(2): 142-149, 2007
- HINTON, H. E. **A fly larva that tolerates dehydration and temperatures of - 270°C to +102°C.** *Nature*. 188: 333-337, 1960.
- HIRAI, K.; TOMIDA, M.; KIKUCHI, Y.; UEDA, O.; ANDO, H.; ASANUMA, N. **Effects of Deuterium Oxide on *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa*.** *Bull Tokyo Dent Coll*, 51, 4, p. 175-183, 2010.
- HO, J. D., YEH, R., SANDSTROM, A., CHORNY, I., HARRIES, W. E. C., ROBBINS, R. A., MIERCKE, L. J. W., STROUD, R. M. **Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance.** *PNAS*, 106(18): 7437-42, 2009
- HOHLEFELDER, L. S.; STÖGBAUER, T.; OPITZ, M.; BAYERL, T. M.; RÄDLER, J. O. **Heavy Water Reduces GFP Expression in Prokaryotic Cell-Free Assays at the Translation Level While Stimulating Its Transcription.** *BioMed Research International*, 2013, p. 1-9, 2013.
- HORIKAWA, D. D., IWATA, K. I., KAWAI, K., KOSEKI, S., OKUDA, T., YAMAMOTO, K. **High hydrostatic pressure tolerance of four different anhydrobiotic animal species.** *Zoological Science*. 26: 238-242, 2009.
- HUGHES, A. M., HILDRETH, P. E., BECKER, G. C. **Genetic effects of deuterium oxide in *Drosophila melanogaster*.** *Genetics*, 49: 715-724, 1964
- ISHIBASHI, K., TANAKA, Y., MORISHITA, Y. **The role of mammalian superaquaporins inside cell.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(5): 1507-12, 2014
- JOHNSON, K. D., HÖFTE, H., CHRISPEELS, M. J. **An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpF).** *The Plant Cell*, 2: 525-532, 1990
- JÖNSSON, K. I. **The evolution of life histories in holo-anhydrobiotic animals: a first approach.** *Integr. Comp. Biol.* 45: 764-770, 2005.
- JUNG, J. S., PRESTON, G. M., SMITH, B. L., GUGGINO, W. B., AGRE, P. **Molecular Structure of the Water Channel through Aquaporin CHIP. The hourglass model.** *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 14648-54, 1994
- KANG, S. A.; HOKE, K. R.; CRANE, B. C. **Solvent Isotope Effects on Interfacial Protein Electron Transfer in Crystals and Electrode Films,** *Journal American Chemistry Society*, 128, p. 2346-2355, 2006.
- KATZ, J. J. **Chemical and Biological Studies with Deuterium.** *American Scientist*, 48, 4, p.544-580, 1960.
- KATZ, J. J., CRESPI, H. L., CZAJKA, D. M., FINKEL, A. J. **Course of deuteration and some physiological effects of deuterium in mice.** *American Journal of Physiology*. 203: 907-913, 1962.
- KAUFMAN, S., LIBBY, W. F. **The natural distribution of Tritium.** *Physica Review*. Vol 93, No 6 pp 1337-1344, 1954.
- KEILIN, D. **The problem of anabiosis or latent life: history and current concept.** *Proc. R. Soc. Lond. B* 150 (939), 149-191, 1959.
- KIM, B., JEONG, K., KIM, V. N. **Genome-wide Mapping of DROSHA Cleavage Sites on Primary MicroRNAs and Noncanonical Substrates.** *Cell*, 66: 258-269, 2017

KIRKINA, A. A.; LOBYSHEV, V. I.; LOPINA, O. D.; DORONIN, Y. K.; BURDEINAYA, T. N.; CHERNOPYATKO, A. S. **Isotopic Effects of Low Concentration of Deuterium in Water on Biological Systems**, *Biophysics*, 59, 2, p. 326-333, 2014.

KORTENOEVER, M. L. A., FENTON, R. A. **Renal aquaporins and water balance disorders**. *Biochimica et Biophysica Acta*, 30(2): 277-288, 2014

KUSHNER, D. J.; BAKER, A.; DUNSTALL, T. G. **Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds**, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 77, p. 79-88, 1999.

KUWAHARA, M., ISHIBASHI, K., GU, Y., TERADA, Y., KOHARA, Y., MARUMO, F., SASAKI, S. **A water channel of the nematode *C. elegans* and its implication for channel selectivity of MIP proteins**. *Am. J. Physiol*, 275(6): C1459-C1464, 1998

LAPINSKI, J., TUNACLIFFE, A. **Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers**. *FEBS Letters*, 553(3): 387-390, 2003

LEE, R. C., AMBROS, V. R. **Na extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans***. *Science*, 294: 862-864, 2001

LI, W., COWLEY, A., ULUDAG, M., GUR, T., MCWILLIAM, H., SQUIZZATO, S., PARKI, Y. M., BUSO, N., LOPEZ, R. **The EMBL-EBI bioinformatics web and programming tools framework**. *Nucleic Acids Res*, 43: W580-W584, 2015

MARCUS, E. **Targidrada**. *Bronn's Klassen und Ordnungem des Tierreichs*, 5: 1- 608, 1929.

MATHIMORE, V.; BATTISTA, J. R. **Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation**, *Journal of Bacteriology*, 178, p. 633-637, 1996.

MCWILLIAM, H., LI, W., ULUDAG, M., SQUIZZATO, S., PARK, Y. M., BUSO, N., COWLEY, A. P., LOPEZ, R. **Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI**. *Nucleic Acids Res*, 41: W597-W600, 2013

MINAMOTO, T; WWADA, E.; SHIMIZU, I. **A new method for random mutagenesis by error-prone polymerase chain reaction using heavy water**. *Journal of Biotechnology*, 157, p. 71-74, 2012.

MORLANDO, M., BALLARINO, M., GROMAK, N., PAGANO, F., BOZZONI, I., PROUDFOOT, N. J. **Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally**. *Nat. Struc. Mol. Biol.*, 15(9): 902-909, 2008

MOSELEY, B. E. B., EVANS, D. M. **Isolation and Properties of Strains of *Micrococcus (Denicoccus) radiodurans* Unable to Excise Ultraviolet Light-induced Pyrimidine Dimers from DNA: Evidence for two excisions pathways**. *Journal of General Microbiology*, 129: 2437-45, 1983.

MURAMATSU, S., MIZUNO, T. **Nucleotide sequence of the region encompassing the *glpKF* operon and its upstream region containing a bent DNA sequence of *Escherichia coli***. *Nucl Acids Res*, 17: 4378, 1989.

MURATA, K., MITSOUKA, K., HIRAI, T., WALZ, T., AGRE, P., HEYMANN, J. B., ENGEL, A., FUJIYOSHI, Y. **Structural determinants of water permeation through aquaporin-1**. *Nature*, 407(6805): 599-605, 2000

MÜLLER, H., ACHILLES-DAY, U. E. M., DAY, H. G. **Tolerance of resting cysts of *Colpoda inflata* (Ciliophora, Colpodea) and *Meseres corlissi* (Ciliophora Spirotrichea) to desiccation and freezing**. *European Journal of Prostiliology*, (46) 133-142, 2010.

OLIVER, M. J., TUBA, Z., MISHLER, B. D. **The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants.** *Pl. Ecol.* 15: 85-100, 2000.

OOMS, J. J. J., LEÓN-KLOOSTERZIEL, K. M., BARTELS, D., KOORNEEF, M., KARSSSEN, C. M. **Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*.** *Pl. Physiol.* 102, 1185–1191, 1993.

PAO, G. M., WU, L. F., JOHNSON, K. D., HÖFTE, H., CHRISPEELS, M. J., SWEET, G., SANDAL, N. N., SAIER, M. H. J. **Evolution of the MIP family of integral membrane transport proteins.** *Molecular Microbiology*, 5(1): 33-37, 1991

PEREIRA, T. C. (Org) **Introdução ao mundo dos microRNAs.** 1ª ed, Editora SGB, 342 p., 2015

PRESTON, G. M., AGRE, P. **Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: Member of an ancient channel family.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 11110-14, 1991

PRESTON, G. M., CARROLL, T. P., GUGGINO, W. B., AGRE, P. **Appearance of Water Channels in *Xenopus* Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein.** *Science*, 256(5055): 385-387, 1992

RAHM, G. **Biologische und physiologische Beiträge zur Kenntnis der Moosfauna.** *Z. Allg. Physiol.* 20: 1-34, 1923.

RAMAZZOTTI, G. **II phylum tardigrada.** *Mem. Instituto Ital. Idrobiol.* 14: 1-595, 1962.

RAO, Y., JAN, L. Y., JAN, Y. N., **Similarity of the product of the *Drosophila* neurogenic gene big brain to transmembrane channel proteins.** *Nature*, 345: 163-167, 1990

REARDON, W., CHAKRABORTEY, S., PEREIRA, T. C., TYSON, T., BANTON, M. C., DOLAN, K. M., CULLETON, B. A., WISE, M. J., BURNELL, A. M., TUNACLIFFE, A. **Expression profiling and cross-species RNA interference (RNAi) of desiccation-induced transcripts in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*.** *BMC Molecular Biology*. 11: 6, 2010.

REHMSMEIER, M., STEFFEN, P., HÖCHSMANN, M., GIEGERICH, R. **Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes.** *RNA*, 10: 1507-17, 2004

ROY, A., KUCUKURAL, A., ZHANG, Y. **I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction.** *Nature Protocols*, 5:725-738, 2010

SAKURAI, M., FURUKI, T., AKAO, K., TANAKA, D., NAKAHARA, Y., KIKAWADA, T., WATANABE, M., OKUDA, T. **Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(13):5093-8, 2008.

SAMIS, H. V.; BAIRD, M. B.; MASSIE, H. R. **Deuterium Oxide Effect on Temperature-Dependent Survival in Populations of *Drosophila melanogaster*.** *Science*. 183 (4123), p. 427=428, 1974.

SANDAL, N. N., MARCKER, K. A. **Soybean nodulin-26 is homologous to the major intrinsic protein of the bovine lens fiber membrane.** *Nucleic Acid Res*, 16: 9347, 1988

SAVAGE, D. F., EGEA, P. F., ROBLES-COLMENARES, Y., O'CONNELL III, J. D., STROUD, R. M. **Architecture and Selectivity in Aquaporins 2.5: Å X-Ray Structure of Aquaporin Z.** *PLoS Biol.*, 1(3): 334-340, 2003

SCHEBOR, C., GALVAGNO, M., BUERA, M. P., CHIRIFE, J. **Glass transition temperatures and fermentative activity of heat-treated commercial active dry yeasts.** *Biotechnology Progress*. 16 (2): 163-168, 2000.

- SCHMIDT, P. **Anabiosis**. *USSR Acad. Sci. Moscow and Leningrad* [In Russian]. 376, 1946.
- SHANNON, A. J., BROWNE, J. A., BOYD, J., FITZPATRICK, D. A., BURNELL, A. M. (2005). **The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics of species and strains of *Panagrolaimus* (Nematoda, Panagrolaimidae)**. *J Exp Biol.* 208: 2433-45, 2005.
- SHEN, M. J., MUDGETT, M. B., SCHOPF, J. W., CLARKE, S., BERGER, R. **Exceptional seed longevity and robust growth: ancient sacred lotus from China**. *Am. J. Bot.* 82: 1367-1380, 1995.
- SIEVERS, F., WILM, A., DINEE, D., GIBSON, T. J., KARPLUS, K., LI, W., LOPEZ, R., MCWILLIAN, H., RMMERT, M., SÖDING, J., THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. **Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega**. *Mol. Syst. Biol.*, 7:539
- SMITH, B. L., AGRE, P. **Erythrocyte Mr 28,000 Transmembrane Protein Exists as a Multisubunit Oligomer Similar to Water Channels Proteins**. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(10): 6407-15, 1991
- STEINER, G., ALBIN, F. E. **Resuscitation of the nematode *Tylenchis polyhypnus* sp., after almost 39 years' dormancy**. *J. Wash. Acad. Sci.* 36: 97-99, 1946.
- STRYER, L. **Biochemistry**. *New York: Freeman*, 1999.
- SUN, W. Q., LEOPOLD, A. C. **Cytoplasmatic vitrification and Survival of Anhydrobiotic Organisms**. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A(3): 327-333, 1997.
- SUSSMAN, A. S., HALVORSON, H. O. **Spores: their dormancy and germination**. *Haper & Row. New York and London*. 354, 1966.
- TAJKHORSHID, E., NOLLERT, P., JENSEN, M. Ø., MIERCKE, L. J. W., O'CONNELL, J., STROUD, R. M., SCHULTEN, K. **Control of the Selectivity of the Aquaporin Water Channel Family by Global Orientation Tuning**. *Science*, 296(5567): 525-530, 2002
- TANGHE, A., VAN DIJCK, P., THEVELEIN, J. M. **Why do organisms have aquaporins**. *Trends in Microbiology*, 14(2): 78-85, 2006
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.1 Schrödinger, LLC (disponível em <https://pymol.org/2/>)
- THOMSON, J. F. **Physiological effects of D2O in mammals**. *Annals of the New York Academy Sciences*. 84: 736-744, 1960.
- TUNNACLIFFE, A.; LAPINSKI, J. **Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of dissacharides in anhydrobiosis**, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 358, 1438, p. 1755-1771, 2003.
- TYSON, T., ZAMORA, G. O., WONG, S., SKELTON, M., DALY, B., JONES, J. T., MULVIHILL, E. D., ELSWORTH, B., PHILIPS, M., BLAXTER, M., BURNELL, A. M. **A molecular analysis of desiccation tolerance mechanisms in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus* using expressed sequence tags**. *BMC Res Not*, 5: 68-99, 2012
- UREY, H. C., BRICKWEDDE, F. G., MURPHY, G. M. **A hydrogen isotope of mass 2 and its concentration**. *Phys. Rev.* 40, 1.
- VAN GUNDY, S. D. **Factors in survival of nematodes**. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3: 43-68, 1965.

VAN HOEK, A. N., HOM, M. L., LUTHJENST, L. H., DE JONG, M. D., DEMPSTER, J. A., VAN OS, C. H. **Functional Characterization of 30 kDa for Proximal Tubule Water Channels as Revealed by Radiation Inactivation.** *J. Biol. Chem.*, 266(25): 16633-35, 1991

VEGIS, A. **Dormancy in higher plants.** *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 15: 185-225, 1964.

VREELEND, R. H., ROSENZWEIG, W. D., POWERS, D. W. **Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal.** *Nature.* 407: 897-900, 2000.

WANG, Y., EZEMADUKA, A. N., TANG, Y., CHANG, Z. **Understanding the Mechanism of the Dormant Dauer Formation of *C. elegans*: From Genetics to Biochemistry.** *IUBMB Life*, 61(6): 607-612, 2009

WEITSCHKE, E., FISCON, G., FELICI, G., BERTOLAZZI, P. **GELA: a software tool for the analysis of gene expression data.** Em *26th International Workshop on Database and Expert Systems Applications* (Ed Chen, Q., Hameurlain, A., Toumani, F., Wagner, R., Decker, H.), 2015

WHITE, L. A., RINGO, J. M., DOWSE, H. B. **Effects of deuterium oxide and temperature on heart rate in *Drosophila melanogaster*.** *J. Comp. Physiol. B*, 162: 278-283, 1992

WILSON, C. G., SHERMAN, P. W. **Anciently asexual bdelloid rotifers escape lethal fungal parasites by drying up and blowing away.** *Science.* 327(5965):574-6, 2010.

WOMERSLEY, C., SMITH, L. **Anhydrobiosis in nematodes. 1. The role of glycerol, myoinositol and trehalose during desiccation.** *Comp. Biochem. Physiol.* 70B, 579-586, 1981.

WOMERSLEY, C. **Biochemical and Physiological Aspects of Anhydrobiosis.** *Comp. Biochem. Physiol.* 70B: 669-678, 1981.

WOMERSLEY, C. Z. **A reevaluation of strategies employed by nematode anhydrobiotes in relation to their natural environment.** In *Vistas on Nematology*. (ed. J. Veech and D. W. Dickson). 165-173, 1987.

YANG, J., YAN, R., ROY, A., XU, D., POISSON, J., ZHANG, Y. **The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction.** *Nature Methods*, 12: 7-8, 2015

ZHANG, Y. **I-TASSER server protein 3D structure prediction.** *BMC Bioinformatics*, 9:40-48, 2008

ZUKER, M. **Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.** *Nucleic Acid Res*, 31(13): 3406-15, 2003