## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Departamento de Genética

Tiago Alves Jorge de Souza

*dnj-16* é provavelmente o resultado de transferência horizontal do gene relacionado ao gravitropismo *ARG1*, de plantas para nematoides, mas não é induzido por hipergravidade de até 400.000 x g em *Caenorhabditis elegans* 

> Ribeirão Preto 2018

Tiago Alves Jorge de Souza

*dnj-16* é provavelmente o resultado de transferência horizontal do gene relacionado ao gravitropismo *ARG1*, de plantas para nematoides, mas não é induzido por hipergravidade de até 400.000 x g em *Caenorhabditis elegans* 

> Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

Ribeirão Preto 2018

### FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Tiago Alves Jorge

*dnj-16* é provavelmente o resultado de transferência horizontal do gene relacionado ao gravitropismo *ARG1*, de plantas para nematoides, mas não é induzido por hipergravidade de até 400.000 x g em *Caenorhabditis elegans*/ Tiago Alves Jorge de Souza; orientador Tiago Campos Pereira – Ribeirão Preto – 2018.

190 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto /USP- Área de concentração: Genética

1. Hipergravidade. 2. Caenorhabditis elegans. 3. dnj-16 4. Arabidopsis thaliana

5. Phytophthora 6. Transferência gênica horizontal (TGH)

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

### Apoio e suporte financeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular da Anidrobiose, localizado no Depto de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) – com apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-FFCLRP/USP

### Dedicatória

Aos meus pais, Nahor e Noemi, pelo auxílio espiritual, emocional e financeiro ao longo da minha trajetória acadêmica; pela compreenção nos momentos em que os meus compromissos me forçaram a estar ausente e pelo amor incondicional demonstrado a mim durante toda a minha vida.

### Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Tiago Campos Pereira, por ter me orientado em todas as etapas desse projeto. Obrigado pela oportunidade oferecida e pela confiança depositada ao longo desses 4 anos e por me proporcionar momentos de aprendizado e reflexão sobre ciência e vida acadêmica. Acima de tudo, agradeço pelo companheirismo durante os momentos desafiadores dessa trajetória.

Aos docentes, funcionários e colegas de pós-graduação do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP pela solicitude, apoio e suporte durante todos esses anos.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP), pela utilização da sua infraestrutura e por proporcionar os recursos para o desenvolvimento da minha pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido.

Aos Professores Doutores: Maria Helena de Souza Goldman, Roy Larson, Geraldo Aleixo S. Passos, Zilá Luz Paulino Simões, Maura Helena Manfrin, Elza Tiemi Sakamoto Hojo, Fernando Luis Medina Mantelatto pela colaboração e por cederem a infraestrutura de seus laboratórios para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos pós-docs: Érica Donato Tanaka, Flávia Cristina de Paula Freitas, Karina Rosa Guidugli Lazzarini, Ana Paula Montaldi, Ernna Hérida Domingues de Oliveira, Dora Yovana Barrios Leal pelo auxílio no desenvolvimento desse projeto.

Aos colegas de pós-graduação Dra. Greice Lubini e Dr. Gabriel Sarti Lopes pela supervisão durante alguns procedimentos experimentais realizados nesse trabalho.

Ao Gabriel de Carli pelo apoio durante a execução desse projeto.

Aos meus queridos amigos de Ribeirão Preto que tornaram minha estadia nessa cidade algo muito prazeroso.

Aos meus irmãos, Israel, Ana Cláudia e Sarah pelas conversas e pelo apoio nos momentos em que mais precisei.

Aos meus pais Nahor e Noemi pelo apoio em todos os momentos, pelas orações, pelas ligações perguntando se eu estava bem, enfim, por me demonstrarem na prática o que é o amor.

Finalmente, gostaria de agradecer a Deus por ter me dado a vida e por permitir que eu tivesse condições intelectuais e emocionais para terminar essa etapa.

#### RESUMO

Souza, T. A. J. *dnj-16* é provavelmente o resultado de transferência horizontal do gene relacionado ao gravitropismo *ARG1*, de plantas para nematoides, mas não é induzido por hipergravidade de até 400.000 x g em *Caenorhabditis elegans*. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2018, 190p.

Durante a anidrobiose (um estado ametabólico muito estável), o nematóide Panagrolaimus superbus tolera vários tipos de estresses físicos. A fim de melhor compreender essa extremotolerância, P. superbus foi submetido a regimes de hiperaceleração (RHA) de até 400.000 x g. Surpreendentemente, foi observado que esse verme tolera a exposição à RHA tanto dessecado (i.e., em anidrobiose) como hidratado. Para verificar se esse fenômeno era específico para essa espécie ou algo observável em outros organismos, os mesmos procedimentos foram realizados no organismo modelo experimentais Caenorhabditis elegans. Intrigantemente, C. elegans também mostrou o mesmo perfil de sobrevivência. Ademais, o desenvolvimento, comportamento, morfologia e crescimento populacional desse nematóide também foram analisados após a exposição ao RHA, não sendo observada quaisquer mudanças nesses parâmetros em função da exposição à hipergravidade. Em seguida, foram realizadas buscas (tBLASTn) no genoma de C. elegans por homólogos de genes relacionados ao gravitropismo que são naturalmente encontrados em plantas. Essa busca resultou nos genes dnj-16 (homólogo ao ARG1), ipla-1 (homólogo ao SGR2) e uma sequência não caracterizada (homóloga a TWD1). Especial atenção foi despendida ao gene dnj-16, uma vez que é o mais conservado entre eles. As análises de RT-qPCR revelaram que o dnj-16 é ligeiramente regulado para baixo durante o RHA, o que não era esperado caso ele possuísse função semelhante ao seu homólogo em plantas. A análise do estado metabólico desse nematoide durante o RHA lançou luz sobre os dados de RT-qPCR, mostrando que a queda na expressão de dnj-16 é provavelmente devida à centrifugação. Posteriormente, diversas análises in silico foram realizadas a fim de caracterizar o gene dnj-16 e a sua respectiva proteína. Inicialmente, a análise comparativa dos domínios DnaJ, transmembrana e coiled coil das proteínas dnj-16, ARG1, ARL1 e ARL2 apontou para uma grande semelhança não apenas na sequência como na estrutura dessas proteínas. Essa grande similaridade motivou análises para desvendar o papel e a origem do gene dnj-16. Três hipóteses ((i) homologia, (ii) convergência e (iii) transferência gênica horizontal (TGH)) foram consideradas na investigação desse intrigante gene. Os resultados obtidos nas análises in silico apontaram para uma TGH mediada por RNA, potencialmente ocorrida a 1325 m.a., como a hipótese mais plausível para explicar a origem de dnj-16 e algumas espécies parasitas do gênero Phytophthora como prováveis mediadores dessa transferência. Dessa forma, os dados apresentados nessa tese mostram pela primeira vez que C. elegans é tolerante a RHA ordens de magnitude mais altas do que se pensava serem compatíveis com a vida multicelular. Além disso, os dados sugerem que dnj-16 foi transferido horizontalmente de plantas para nematoides e que a ultracentrifugação leva a uma redução no metabolismo de C. elegans, o que ajudaria a explicar a sua sobrevivência sob tal condição extrema. Por fim, o conjunto de dados desse trabalho representa contribuições originais para a compreenção da biologia, da genética e da evolução de C. elegans.

#### ABSTRACT

Souza, T. A. J. *dnj-16* is probably the result of horizontal gene transfer of ARG1 gravitropism related gene, from plants to nematodes, but is not induce by hypergravity up to 400,000 x g in *Caenorhabditis elegans*. [PhD Thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2018, 190p.

During anhydrobiosis (a very stable ametabolic state), the nematode Panagrolaimus superbus tolerates many types of physical stresses. In order to better understand this extremotolerance, P. superbus underwent hyperacceleration regimes (RHA) of up to 400,000 x g. Surprisingly, it was observed that this worm tolerated RHA exposure both dried (*i.e.*, during anhydrobiosis) and hydrated. In order to verify if this phenomenon was specific for this species or something observable in other organisms, the same experimental procedures were performed in the model organism Caenorhabditis elegans. Intriguingly, C. elegans also showed the same survival profile. In addition, the development, behavior, morphology and population growth of this nematode were also analyzed after the exposure to RHA and no changes were observed in these parameters due to the hypergravity exposure. Thereafter, searches (tBLASTn) were performed on C. elegans genome by homologs of gravitropism related genes that are naturally found in plants. These searches resulted in the genes *dnj-16* (homologous to ARG1), *ipla-1* (homologous to SGR2) and an uncharacterized sequence (homologous to TWD1). Special attention was given to *dnj-16* gene, since it is the most conserved among them. RT-qPCR analyzes revealed that *dnj-16* is slightly down regulated during RHA, which was not expected if it had similar function to its homologue in plants. Analysis of the metabolic status of this nematode during RHA shed light on the RT-qPCR data, showing that the decrease in *dnj-16* expression was probably due to centrifugation. Subsequently, several in silico analyzes were performed in order to characterize the *dnj-16* gene and its respective protein. Initially, the comparative analyzis of the DnaJ, transmembrane and coiled coil domains of dnj-16, ARG1, ARL1 and ARL2 proteins pointed to a great similarity not only in the sequence as well as in the structure of these proteins. This great similarity motivated analyzes in order to uncover the real nature of the *dnj-16* gene. Three hypotheses ((i) homology, (ii) convergence and (iii) horizontal gene transfer (HGT)) were considered in the investigation of this intriguing gene. The results obtained in the *in silico* analyzes indicated an RNA mediated TGH, potentially occurred 1325 my (millions of years), as the most plausible hypothesis to explain the origin of *dnj-16* and some parasitic species of the Phytophthora genus as probable mediators of this transference. Therefore, data presented in this thesis show for the first time that C. elegans tolerates RHA of magnitude orders higher than it was thought to be compatible with multicellular life. In addition, the data suggest that *dnj-16* was transferred horizontally from plants to nematodes and that ultracentrifugation leads to a reduction in C. elegans metabolism, which would help explain its survival under such extreme condition. Finally, the data set of this work represent original contributions to the understanding of the C. elegans' biology, genetics and evolution.

## SUMÁRIO

CONTEXTUALIZAÇÃO22
--------------------

1. INTRODUÇÃO	
1.1. <i>C. elegans:</i> um modelo de pesquisa	
1.1.1. Descoberta	25
1.1.2. Descrição da espécie	25
1.1.3. Padronização de C. elegans como um modelo de estudo	
1.1.4. Novas aplicações de <i>C. elegans</i> como modelo de estudo	27

1.4. Estresse gravitacional	
1.4.1. Gravidade	
1.4.2. Resposta de organismos à hipergravidade	29
1.4.3. Resposta de C. elegans ao estresse gravitacional	31
1.5. Genes responsivos à gravidade em plantas	
1.6. Hipótese e Justificativa	34

2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo geral	
2.2. Objetivos específicos	

# 

3.7.2. Mensuração da atividade metabólica	41
3.8. Aspectos evolutivos	42
3.8.1. Busca <i>em C. elegans</i> por homólogos de genes de plantas associad gravitropismo	los ao 42
3.8.2. Caracterização do gene <i>dnj-16</i>	48
3.8.3. Predição dos domínios transmembrana e <i>coiled coil</i> das proteínas dnj-16, ARL1 e ALR2	ARG1, 48
3.8.4. Rede de interações proteicas de dnj-16 e ARG1	49
3.8.5. Comparação entra as sequências nucleotídicas de dnj-16, ARG1, ARL1 e ARL2	249
3.8.6. Elaboração de filogenias proteicas e nucleotídicas	49
3.8.7. Análise de TGH via <i>codon usage</i>	50
3.8.8. Análise de conservação de sintenia	51
3.8.9. Análise do GC% de <i>dnj-16</i> (CDS) e das " <i>coding sequences</i> " de <i>C. elegans, P</i> e <i>G. max</i>	P. sojae 51
3.8.10. Análise das regiões reguladoras do gene <i>dnj-16</i>	51
3.8.11. Análise de evolução neutra	52
3.8.12. Análise de homologia	53
3.8.13. Caracterização do domínio COA	54
3.8.14. Análise de sequências homólogas ao domínio DnaJ do gene dnj-16	55
3.9. Análise estatística	55
4. RESULTADOS	57
4.1. Aspectos físicos	58
4.2. Aspectos moleculares	59
4.3. Aspectos evolutivos	63
5. DISCUSSÃO	94
5.1. Hipergravidade	95
5.2. Aspectos físicos	95
5.3. Aspectos moleculares	96
5.4. Aspectos evolutivos	98
5.4.1. Caracterização de dnj-16 e dos seus homólogos ARG1, ARL1 e ARL2	98

5.4.2. Origem do gene <i>dnj-16</i> de <i>C. elegans</i>	100
5.4.3. Análises filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas e prote	icas de ARG1 e
dnj-16	101
5.4.4. Análise das regiões flanqueadoras do gene <i>dnj-16</i>	102
5.4.5. Análise do <i>codon usage</i> e do conteúdo de GC	103
5.4.6. Estrutura do gene <i>dnj-16</i> e dos seus homólogos nas espéc <i>Phytothphtora</i>	cies do gênero 104
5.4.7. Análise das regiões reguladoras de <i>dnj-16</i>	104
5.4.7.1. Região promotora	104
5.4.7.2. Sítios de terminação	105
5.4.8. Aspectos evolutivos da TGH de <i>dnj-16</i>	106
5.4.9. C. elegans: um novo modelo de estudo para resposta à hipergravidade	108
5.4.10. Síntese	110
7. REFERÊNCIAS	
7. REFERÊNCIAS 8. APÊNDICE	
7. REFERÊNCIAS 8. APÊNDICE 8.1. APÊNDICE I	
7. REFERÊNCIAS 8. APÊNDICE 8.1. APÊNDICE I 8.2. APÊNDICE II	
7. REFERÊNCIAS 8. APÊNDICE 8.1. APÊNDICE I 8.2. APÊNDICE II 8.3. APÊNDICE III	
7. REFERÊNCIAS	117 129 130 140 141 142 
7. REFERÊNCIAS	117 129 130 140 141 141 142 143
7. REFERÊNCIAS	
7. REFERÊNCIAS	117 129 130 140 141 142 143 144 152 153 154 157 161

1. MATERIAL E MÉTODOS	
1.1. Manutenção	
1.1.1. Sementes	
1.1.2. Moscas	
1.2. Procedimento experimental	
1.2.1. Drosophila melanogaster	
1.2.2. Nicotiana Benthamiana	
1.3. Análise estatística	
2. RESULTADOS	
2.1. Drosophila melanogaster	
2.2. Nicotiana benthamiana	
3. DISCUSSÃO	
3.1. Drosophila melanogaster	
3.2. Nicotiana benthamiana	
4. REFERÊNCIAS	
8.13. APÊNDICE XIII	
8.14. APÊNDICE XIV	
8.15. APÊNDICE XV	
8.16. APÊNDICE XVI	

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 A-C. Exemplos de organismos extremófilos, extremo-resistentes e extremo-tolerantes.
Figura 2. A espécie-modelo <i>C. elegans</i>
<b>Figura 3.</b> Esquema ilustrativo das características gerais que credenciam <i>C. elegans</i> como um modelo de estudo para diversos campos de estudo ( <i>e.g.</i> neurobiologia, apoptose, desenvolvimento, doenças humanas e estresse)
Figura 4. Esquema ilustrativo dos resultados obtidos por Kim e colaboradores (2007)33
Figura 5. Porcentagem de sobrevivência (viabilidade) de <i>C. elegans</i> após exposição a diferentes condições experimentais
Figura 6. Crescimento populacional (%) de <i>C. elegans</i> mensurado 10 dias após exposição a diferentes condições experimentais
Figura 7. Imagens dos vermes em placa NGM ágar logo após exposição a diferentes condições experimentais
Figura 8. Expressão relativa do gene <i>dnj-16</i> de <i>C. elegans</i> após exposição a diferentes condições experimentais
Figura 9. Valores de OD obtidos após a exposição de <i>C. elegans</i> a diferentes condições de hipergravidade
<b>Figura 10.</b> Alinhamento dos domínios DnaJ, transmembrana e <i>coiled coil</i> das proteínas dnj16 (378 aa), dnj-16 (395 aa), ARG1, ARL1 e ARL2
<b>Figura 11.</b> Predição do domínio transmembrana da proteína (A) sid-1 (B) dnj-16 (378 aa), (C) dnj-16 (395 aa), (D) ARG1, (E) ARL1, (F) ARL2 por meio do software Phobius
<b>Figura 12.</b> Predição da estrutura <i>coiled coil</i> (A) dnj-16 (378 aa), (B) dnj-16 (395 aa), (C) ARG1, (D) ARL1, (E) ARL2 por meio do software Prabi
<b>Figura 13.</b> Reconstituição da estrutura tridimensional das proteínas (A) dnj-16 (378 aa), (B) dnj-16 (395 aa), (C) ARG1, (D) ARL1, (E) ARL2
Figura 14. Rede de interações das proteínas dnj-16 (378 aa) e ARG1 gerada pelo software String
<b>Figura 15.</b> Alinhamento das sequências gênicas (éxons e íntrons) dos genes <i>dnj-16</i> e <i>ARG1</i> utilizando o software Clustal Omega
Figura 16. Alinhamento dos CDS dos genes <i>dnj-16</i> e <i>ARG1</i> por meio do software Clustal Omega
Figura 17. Filogenia baseada em dnj-16 (sequência proteica)75
Figura 18. Filogenia baseada em <i>dnj-16</i> (sequência nucleotídica - CDS)76

<b>Figura 19.</b> Resultado do tBLASTx entre (i) 2 genes <i>upstream</i> a <i>dnj-16</i> (no cromossomo de <i>C. elegans</i> e 1 gene <i>downstream</i> ( <i>xbp-1</i> ) e (ii) contra a região que envolve 2 genes <i>upstream</i> à região homóloga a <i>dnj-16</i> no cromossomo de <i>Phytophthora infestans</i> , e 1 gene <i>downstream</i>
<b>Figura 20.</b> Sequências genômicas (verde), de mRNA (azul) e proteicas (vermelho) presentes no (A) gene de <i>Phytothphtora parasitica</i> homólogo a <i>dnj-16</i> (NW_008649063.1) e nos genes que o flanqueia
<b>Figura 21.</b> Sequências genômicas (verde), de mRNA (azul) e proteica (proteica) presentes no gene (NW_003303684.1) de <i>P. infestans</i> homólogo a <i>dnj-16</i> 83
<b>Figura 22.</b> Análise da sequência genômica do gene <i>ARG1</i> (NC_003070.9 (2563168925634780) de <i>A. thaliana</i> a partir dos dados de RefSeq do TAIR
<b>Figura 23.</b> Estrutura dos éxons e íntrons do gene <i>dnj-16</i> e localização de regiões de ligação de fatores de transcrição (linhas em verde) representando a possível localização da região promotora de <i>dnj-16</i>
<b>Figura 24.</b> Estrutura (íntrons e éxons) das isoformas do gene <i>dnj-16</i> e suas respectivas taxas de expressão obtidas a partir de dados de RNA Seq (blocos em preto)
<b>Figura 25.</b> Resultado da busca (BLASTn) realizada utilizando a sequência promotora de <i>dnj-16</i> como isca contra o gênero <i>Phytophthora</i>
Figura 26. Caracterização da região <i>downstream</i> ao gene <i>dnj-16</i> de C. elegans ( <i>upstream</i> ao gene <i>xbp-1</i> )
<b>Figura 27.</b> Teste de evolução neutra envolvendo as sequências homólogas a <i>dnj-16</i> das espécies <i>C. remanei, C. briggsae, C. elegams, Capsicum annum, S. lycopersicum</i> e <i>A. thaliana</i> 89
Figura 28. Resultado da busca (tBLASTn) utilizando a sequência quimérica dos domínios DnaJ de <i>C. elegans</i> e COA de plantas como isca contra as espécies do gênero <i>Phytophtora</i>
<b>Figura 29.</b> Resultado da busca (BLASTp) da sequência fusionada do domínio de DnaJ de <i>C. elegans</i> com o domínio COA de plantas contra sequências proteicas de homólogos de <i>dnj-16</i> em 10 espécies de plantas ( <i>Capsicum anuum, Prunus persica, Solanum lycopersicum, Lupinus angustifolius, Juglans regia, Vigna radiata, Medicago truncatula, Jatropha curcas, Phaseolus vulgaris, Brassica rapa)</i>
Figura 30. Resultado da busca (BLASTp) utilizando a proteína dnj-16 (378 aa) contra viridiplantae
<b>Figura 31.</b> Modelo proposto de eventos de TGH responsáveis pela origem de <i>dnj-16</i> em nematoides
Figura 32. Estrutura (éxons e íntrons) do gene <i>dnj-16</i> 112
<b>Figura 33.</b> Esquema ilustrativo das principais conclusões obtidas a partir dos resultados do presente trabalho115

### 8.2. APÊNDICE II

Figura 1. Imagem de dois vermes <i>C. elegans</i>
---

## 8.3. APÊNDICE III

Figura 1. Esquema ilustrativo dos parâmetros morfológicos avaliados após a exposição de	
vermes C. elegans a 400.000 x g durante 1h14	11
<b>Figura 2.</b> Imagem do fenótipo de <i>rolling</i> observado em <i>C. elegans</i> no qual o movimento ao redor do próprio eixo corporal pode ser claramente visualizado14	-1

## 8.10. APÊNDICE X

Figuura 1. Resultado da busca (BLASTn) realizada utilizando a sequência promotora de <i>dnj</i> -
16 como isca contra o gênero Phytophthora
<b>Figura 2.</b> Resultado da busca (BLASTn) usando o primeiro íntron de <i>dnj-16</i> (promotor) contra RNA ref-seq de plantas (viridiplantae) a fim de testar a hipótese de uma origem desse íntron a partir da 5' UTR de plantas
<b>Figura 3.</b> Sequência nucleotídica de <i>Arabidopsis lyrata</i> (XM_021031567.1) homóloga ao primeiro íntron de <i>dnj-16</i>

# 8.11. APÊNDICE XI

Figura 1. A. Sítios de terminação (elementos de clivagem (vermelho); elementos cis para a
poliadenilação do mRNA (cinza); sítio rico em "GU" típico de mamíferos (azul)) B. Modelo
sintético da região promotora de <i>dnj-16</i> 161

### 8.12. APÊNDICE XII

Figura 1. Viabilidade das larvas após a exposição a diferentes condições experimentais164
<b>Figura 2.</b> Imagens das larvas (3° instar) dos diferentes grupos após a exposição às diferentes condições experimentais
Figura 3. Imagens das sementes obtidas após a exposição às diferentes condições experimentais
<b>Figura 4.</b> Imagens das sementes de <i>Nicotiana benthamiana</i> após a exposição às diferentes condições experimentais
<b>Figura 5.</b> Plântulas de <i>Nicotiana benthamiana</i> obtidas duas semanas após a exposição às diferentes condições experimentais
<b>Figura 6.</b> Porcentagem de sementes que germinaram após a exposição às diferentes condições experimentais

## 8.13. APÊNDICE XIII

Figura 1 A-B	<b>B.</b> Resultado da busca (BLASTn) utilizando a sequência do primeiro íntron de	
<i>dnj-16</i> como	isca169	)

## 8.14. APÊNDICE XIV

Figura 1.	Resultado	da busca	(BLASTn)	realizado	utilizando	como	isca a s	equênci	ia
intergênic	a entre <i>dnj</i> -	16 e <i>xbp</i> -	1	•••••		•••••	•••••		171

## 8.15. APÊNDICE XV

<b>Figura 1.</b> Resultado da busca (BLASTn) utilizando o mRNA (CDS) de <i>dnj-16</i> (378 aa) contra ("viridae", "retroviridae" e "retro-transcribing viruses", todos conjuntamente)173
Figura 2. Resultado da busca (tBLASTn) utilizando como isca a proteína dnj-16 (378 aa) contra "viridae"
<b>Figura 3.</b> Resultado da busca (BLASTn) utilizando como isca o CDS de dnj-16 (378 aa) contra "transposons"

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência nucleotídica dos primers utilizados na análise de RT-qPCR41
<b>Tabela 2.</b> Código dos genes, CDS e proteínas utilizados nas buscas por BLAST para a análiseda origem, estrutura e função do gene <i>dnj-16</i> de <i>C. elegans</i>
<b>Tabela 3.</b> Resultado da busca (tBLASTn) em <i>C. elegans</i> por homólogos de alguns genes de plantas associados ao gravitropismo
<b>Tabela 4.</b> Características das mutações em ARG1, ARL1 e ARL2 descritas na literatura eseus efeitos no gravitropismo
<b>Tabela 5.</b> Resultado da busca (tBLASTn) por sequências nucleotídicas que codificassem proteínas homólogas a dnj-16 de <i>C. elegans</i>
<b>Tabela 6.</b> Resultado do teste Tajima de Neutralidade das sequências homólogas das espéciesC. remanei, C. briggsae, C. elegams, Capsicum annum, S. lycopersicum e A. thaliana90
<b>Tabela 7</b> . Divergência média de identidade (DMI) e a divergência média de similaridade(DMS) entre pares de genes homólogos (C. elegans x A. thaliana) e pares dnj-16/ARG1(Caenorhabiditis sp. x A. thaliana)

### 8.6. APÊNDICE VI

<b>Tabela 1.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes    aminoácidos em <i>C. elegans</i> obtida	144
<b>Tabela 2.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína dnj-16 de <i>C. elegans</i>	.144
<b>Tabela 3.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína actin-1 de <i>C. elegans</i>	145
<b>Tabela 4.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína H4 de <i>C. elegans</i>	145
<b>Tabela 5.</b> Frequência de utilização de códons específicos para a produção dos diferentes aminoácidos em <i>A. thaliana</i>	146
<b>Tabela 6.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína ARG1 de <i>A. thaliana</i>	146
<b>Tabela 7.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína act 2 de <i>A. thaliana</i>	.147
<b>Tabela 8.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína H4 de <i>A. thaliana</i>	147

<b>Tabela 9.</b> Frequência de utilização de códons específicos para a produção dos diferentesaminoácidos em G. max
<b>Tabela 10.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentesaminoácidos da proteína LOC102668432 de <i>G. max</i>
<b>Tabela 11.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentesaminoácidos da proteína act-11 de G. max
<b>Tabela 12.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentesaminoácidos da proteína H4 de G. max
<b>Tabela 13.</b> Frequência de utilização de códons específicos para a produção dos diferentesaminoácidos em P. sojae
<b>Tabela 14.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentesaminoácidos da proteína de P. sojae homóloga à dnj-16150
<b>Tabela 15.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentesaminoácidos da proteína act-1 de <i>G. max</i>
<b>Tabela 16.</b> Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentesaminoácidos da proteína H4 de G. max

### 8.7. APÊNDICE VII

Tabela 1. Conteúdo de GC (%) presentes no gene dnj-16 e nas "coding sequences" o	de <i>C</i> .
elegans, G. max, A. thaliana, P. sojae	152

### 8.8. APÊNDICE VIII

### 8.9. APÊNDICE IX

Tabela 1.	Espécies (	citadas nas	diversas	análises	realizadas	nesse tr	abalho c	om as suas	
respectivas	s abreviaç	ões				••••••			.154

### LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E ACRÔNIMOS

aa: aminoácido.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): ferramenta de alinhamento de busca local.

BLASTn (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*): ferramenta de alinhamento de busca local de nucleotídeos.

BLASTp (*Protein Basic Local Alignment Search Tool*): ferramenta de alinhamento de busca local de proteínas.

tBLASTn (*Translated Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*): ferramenta de alinhamento de busca local de sequências nucleotídicas traduzidas.

tBLAStx (*Translated Basic Local Alignment Search Tool*): ferramenta de alinhamento de busca local traduzida.

COA (Chlorophyllide a oxygenase): domínio clorofila oxigenase a.

CDS (Coding DNA Sequence): sequência de DNA codificante.

CE (coordinate cleavage site): sítio coordenado de clivagem.

CN1: Controle Negativo 1.

CN2: Controle Negativo 2.

cpDNA (chloroplast Deoxyribonucleic acid): DNA cloroplastidial

DEG/ENAC (Degenerin/epithelial Sodium Channel): canal de sódio epitelial/degenerina.

DMSO (Dimethyl sulfoxide): dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo.

FUE (*far upstream element*): elemento localizado a uma longa distância acima de um ponto referencial.

g: aceleração da gravidade.

GABA (gamma-aminobutyric acid): ácido aminobutírico gamma.

GE: grupo experimental.

m.a.: milhões de anos.

máx: máximo.

MCL (Maximum Composite Likelihood): abordagem de probabilidade da composição máxima.

MOLI: Microscópio Óptico de Luz Invertida.

min: minuto.

nDNA (nuclear Deoxyribonucleic acid): DNA nuclear

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): centro nacional de informações biotecnológicas.

NUE (*near upstream element*): elemento localizado a uma curta distância acima de um ponto referencial.

nr: sequências não redundantes.

pb: pares de bases.

RNA Pol CHiP-seq (*ribonucleic acid polymerase chromatin immunoprecipitation sequencing*): sequenciamento de imunoprecipitação de cromatina associada à RNA polimerase.

RT-qPCR (*Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction*): transcrição reversa – reação em cadeia de polimerase quantitativa.

TAIR (The Arabidopsis Information Resource): recurso de informação de Arabidopsis.

TGH: Transferência Gênica Horizontal.

RNAi (*Ribonucleic acid of interference*): Interferência por RNA.

RNA ref-seq (*Ribonucleic acid reference sequence*): sequenciamento a partir de transcritos.

UTR (Untranslated Region): região não traduzida.

w/v (weight/volume): concentração em 'peso por volume'.

### CONTEXTUALIZAÇÃO

Os organismos que sobrevivem às condições de estresses físicos e biológicos extremos podem ser classificados em três grupos distintos: (i) extremófilos; (ii) extremo-resistentes e (iii) extremo-tolerantes. Extremófilos são organismos que se desenvolvem normalmente em ambientes que seriam hostis ou letais para a imensa maioria de formas de vida terrestre (*e.g.* a archaea *Methanopyrus kandleri*) (RAMPELOTTO, 2013). Por outro lado, organismos extremo-resistentes são capazes de impedir que as condições estressoras comprometam a sua viabilidade (*e.g.* bactéria *Staphylococcus aureus* resistente a drogas) (MAGIORAKOS et al., 2012). Por fim, organismos extremo-tolerantes são aqueles capazes de modificar a sua biologia a fim de suportar as situações estressoras (*e.g.* o nematoide *Panagrolaimus superbus*). O estudo dessas três classes de organismos é de elevada importância para se delimitar as condições compatíveis com a vida como nós a conhecemos (Figura 1).



Figura 1 A-C. Exemplos de organismos extremófilos, extremo-resistentes e extremo-tolerantes. A. *M. kandleri* (extremófilo); B. *S. aureus* (extremo-resistente); C. *P. superbus* (extremo-tolerante). Fonte: domínio público.

Em face a dessecação extrema (perda excessiva de água intracelular), alguns organismos extremo-tolerantes possuem a capacidade de entrar em um estado de animação suspensa conhecido como *anidrobiose* (do grego: *vida sem água*). Curiosamente, em anidrobiose esses organismos são capazes de tolerar diferentes tipos de estresses (*e.g.* temperaturas extremas, radiações ionizantes, vácuo, altos valores de pressão hidrostática, hipogravidade) (BELTRÁN-PARDO et al., 2013; HENGHERR et al., 2009; HORIKAWA et al., 2009; JÖNSSON et al., 2008; TUNNACLIFFE & LAPINSKI, 2003). A fim explorar o espectro de situações extremas toleradas por esses organismos, optamos por estudar situações de hipergravidade extrema. Dessa forma, o nematoide anidrobioto *P. superbus*, em animação suspensa, foi exposto a 400.000 x *g* durante 1h a 4°C. Como controle, foram utilizados indivíduos hidratados expostos às condições experimentais. Surpreendentemente, verificamos que não apenas os vermes dessecados como também os hidratados resistiram à hipergravidade extrema (SOUZA; CARLI; PEREIRA, 2017) (APÊNDICE I). Essa constatação inesperada nos motivou a explorar a fundo essa questão utilizando o organismo modelo *Caenorhabditis elegans*, o qual possui várias similaridades com *P. superbus*.

<u>1. INTRODUÇÃO</u> 24

### 1. INTRODUÇÂO

#### 1.1. C. elegans: um modelo de pesquisa

### 1.1.1. Descoberta

O organismo *C. elegans* foi isolado e descrito juntamente com outros nematoides pelo zoólogo francês Émile Maupas na transição entre os séculos XIX e XX (MAUPAS, 1899, 1900). Em sua descrição, Maupas não se preocupou em detalhar a sistemática desses organismos, mas utilizou uma abordagem experimental, ressaltando as funções que credenciassem alguns nematoides (*e.g. Rhabditis coronata, Diplogaster robustus, Rhabditis elegans*) como modelos biológicos de estudo. Interessantemente, ele deu especial atenção ao verme *Rhabditis elegans* (*Rhabditis* "haste"; *elegans* "delgado"). Posteriormente, na década de 1950, estudos filogenéticos e taxonômicos (DOUGHERTY, 1953; OSCHE, 1952) resultaram na divisão das espécies do gênero *Rhabditis* em vários novos gêneros como o gênero *Caenorhabditis*, no qual foi enquadrado o nematoide *Rhabditis elegans* inicialmente descrito por Maupas, que passou a ser chamado de *Caenorhabditis elegans* (*Caeno* "recente"; *rhabditis* "haste"; *elegans* "delgado") (NIGON & FÉLIX, 2017).

#### 1.1.2. Descrição da espécie

*C. elegans* é um nematoide de vida livre que apresenta comprimento de 1 mm na fase adulta e 0,25 mm nos primeiros estádios. O desenvolvimento desse organismo se inicia com o ovo seguido por quatro estadios larvais (L1, L2, L3 e L4) e o adulto. O ciclo de vida é curto e pode ter variações na sua duração de acordo com a temperatura de cultivo, sendo de 3,5 dias a 20°C e 3 dias a 25°C. Além disso esse nematoide é eutélico, *i.e.*, apresenta um número fixo de células no indivíduo adulto (~1.000), das quais 302 são neurônios. A ampla maioria dos indivíduos são hermafroditas, possuindo a capacidade de autofertilização e uma pequena porcentagem (~0,2%) é formada por machos. O sexo é determinado pela proporção de cromossomos X, sendo que os indivíduos hermafroditas possuem dois cromossomos X ao passo que os machos apresentam apenas um cromossomo X. Levando em conta que um indivíduo hermafrodita pode originar uma progênie de aproximadamente 300 indivíduos por meio de autofecundação, enquanto que até 1.000 indivíduos podem ser originados no caso de um verme hermafrodita ser fertilizado por um macho, o crescimento populacional se dá de forma acelerada (CORSI et al. 2015) (Figura 2).



**Figura 2.** A espécie-modelo *C. elegans.* Um verme adulto *de C. elegans* (~1mm) em meio NGM ágar pode ser visto na parte central da imagem. Ao redor, o ciclo de vida de *C. elegans* (3 a 4 dias) a 20°C. Imagem original do WormAtlas.

#### 1.1.3. Padronização de C. elegans como um modelo de estudo

Nas décadas de 1950 e 60, o cientista Sidney Brenner já havia realizado importantes experimentos com bactérias, os quais contribuíram para o surgimento e estabelecimento do campo da Biologia Molecular. No entanto, desejoso de iniciar pesquisas em neurobiologia e desenvolvimento, e consciente das limitações envolvidas na utilização dos organismos procariotos que usava até então, passou a dirigir os seus esforços no sentido de estabelecer um novo organismo modelo (NIGON & FÉLIX, 2017). Orientado pelos trabalhos realizados por Goldschmidt (1908 e 1909), Brenner direcionou suas buscas às diferentes espécies de nematoides até então descritas; após isolar várias linhagens acabou por estabelecer *C. elegans* como um organismo modelo (BRENNER, 1974). A eutelia observada nesse nematoide, por exemplo, permitiu o fácil mapeamento de toda a sua rede neural como também o estudo detalhado do seu desenvolvimento. Essa e outras características supracitadas no item 1.1.2, aliadas ao fácil cultivo e manutenção de *C. elegans* em laboratório, beneficiaram não apenas os

campos da neurobiologia e desenvolvimento, mas também diversas outras áreas de pesquisa nas quais esse organismo foi adotado como um modelo de estudo (Figura 3).



Figura 3. Esquema ilustrativo das características gerais que credenciam *C. elegans* como um modelo de estudo para diversos campos de estudo (*e.g.* neurobiologia, apoptose, desenvolvimento, doenças humanas e estresse). O fácil cultivo em placas de ágar revestidas de bactérias, o rápido crescimento populacional devido à grande quantidade de indivíduos hermafroditas, a fácil observação ao microscópio devido ao seu tamanho e transparência corpórea e a possibilidade da crio-estocagem são algumas das características que respaldam a versatilidade desse organismo como um modelo de estudo. Imagem original (*C. elegans*) do WormAtlas.

#### 1.1.4. Novas aplicações de C. elegans como modelo de estudo

No universo das possíveis aplicações de *C. elegans* como modelo de estudo, uma das mais recentes e surpreendentes descobertas foi a possibilidade de se utilizar essa espécie como modelo de estudo da anidrobiose, *i.e.*, a tolerância à dessecação extrema (ERKUT et al. 2011,

2013). Erkut e colaboradores (2011) demonstraram que um estadio alternativo do ciclo de *C. elegans* denominado de larva dauer é capaz de tolerar a dessecação, entrando em um estado de animação suspensa (ametabólico) conhecido como anidrobiose. No entanto, a resiliência a condições extremas observada nesse nematoide não se resume à sua tolerância à dessecação: estudos têm demonstrado que *C. elegans* é capaz de suportar também outros tipos de estresse como a exposição a radiações ionizantes (ONODERA et al. 2010; TANG et al. 2016) e baixas temperaturas (UJISAWA et al., 2014). Os mecanismos envolvidos na tolerância a esses estresses ainda são pouco conhecidos e podem estar relacionados com a atividade de elementos de transposição.

### 1.4. Estresse gravitacional

#### 1.4.1. Gravidade

A gravidade terrestre molda a vida como a conhecemos. Espécies na superfície da Terra experimentam uma força de 1 x g, isto é, uma aceleração de 9,8 m/s<sup>2</sup> em direção ao centro do planeta. Portanto, corpos que sejam acelerados a valores acima 9,8 m/s<sup>2</sup> (*i.e.*, >1 x g), como em circunstâncias de colisão ou centrifugação, estão em regime de hipergravidade. De maneira oposta, corpos submetidos a acelerações abaixo de 9,8 m/s<sup>2</sup> (*i.e.*, <1 x g), como em situações de queda livre ou voos espaciais, estão em regime de micro- ou hipogravidade. Em humanos e outros mamíferos a percepção da gravidade é essencial, por exemplo, para a diferenciação celular, controle da temperatura corporal, regulação do sistema endócrino e para os processos relacionados ao envelhecimento (LE BOURG, 1999; MACHO et al. 2001; MOREY-HOLTON 2003).

Os astronautas enviados em missões espaciais experimentam uma série de ambientes com gravidade alterada. Eles são expostos à hipergravidade durante o lançamento e durante a aterrissagem e microgravidade enquanto estão na órbita ou em trânsito no espaço (CLARK et al. 2015). A percepção humana espacial e da gravidade está relacionada com o sistema vestibular localizado no ouvido interno. Esse sistema é formado pelos órgãos sáculo e utrículo, os quais são responsáveis por responder aos movimentos de inclinação e translação da cabeça. Esses dois órgãos possuem um epitélio sensorial denominado de mácula, o qual é formado por *células ciliadas* em associação a *células de suporte*, que por sua vez estão imersas em uma camada gelatinosa. Acima dessa camada gelatinosa está localizada a membrana otolítica (PURVES et al., 2001).

Nessa membrana existem pequenos cristais embebidos em uma espécie de endolinfa que são denominados de otólitos. Esses cristais se deslocam após a exposição a condições de hipo- e hipergravidade, estimulando os cílios que, por sua vez, passam a informação para o cérebro (PURVES et al., 2001). Quando em um ambiente de hipogravidade, os astronautas passam a flutuar e acabam perdendo os referencias espaciais aos quais estavam acostumados no ambiente terrestre. Sem esses referenciais, os otólitos juntamente com as células ciliadas passam a enviar ao cérebro informações embaralhadas, o que resulta em enjoos e tonturas. Nesse contexto, uma série de modelos matemáticos tem sido proposta na tentativa de estimar o possível o impacto de alterações da gravidade na percepção espacial em humanos (CLARK et al. 2015).

#### 1.4.2. Resposta de organismos à hipergravidade

No século XX os físicos Ernest Mach e Albert Einstein chegaram à conclusão de que a aceleração e a gravidade são forças equivalentes (HALLIDAY et al., 1993, RUSSOMANO et al., 2007), produzindo assim os mesmos efeitos nos seres vivos. Dessa forma, o método mais utilizado até os dias de hoje para simular condições de hipergravidade é a centrifugação (BRADAMANTE et al., 2006).

Graças ao desenvolvimento de centrífugas de alto desempenho a partir das primeiras décadas do século XX, capazes de chegar até a  $10^5 \times g$  (Figura 3) (BEAMS & WEDD, 1931; FAHIE & BROWN, 1936), vários trabalhos passaram a ser realizados expondo à hipergravidade os mais diversos organismos como: bactérias (DEGUCHI et al., 2011), algas (GAO et al., 2013), fungos (ZALOKAR, 1960), plantas (BEAMS, 1949; BEAMS; KING, 1935b; WALDRON & BRETT, 1990), insetos (HILL et al., 2012), tunicatos (LYON, 1907), aranhas (LYON, 1907), nematoides (BEAMS & KING, 1936a), moluscos (MORGAN, 1910), equinodermos (HARVEY, 1933 a,b), peixes (MORGAN, 1910), aves (BEAMS & KING, 1936b), mamíferos (BEAMS; KING, 1935a; DALIGCON & OYAMA, 1975). O desenvolvimento de centrífugas cada vez mais potentes culminou com a elaboração de uma centrífuga capaz de chegar até espantosos 1.000.000.000 x g (1 bilhão de g; GRAY, 1951).

Apesar dos inúmeros estudos realizados utilizando a ultracentrifugação para simular condições de hipergravidade (geralmente até  $10^2 \times g$ ), poucos analisaram forças na ordem  $\ge 10^5 \times g$  (BEAMS, 1949; BEAMS KING 1935a, 1936a, 1937; BOUCK, 1963; DEGUCHI et al., 2011; GAO et al., 2013; KWON; OONO, 1992), permanecendo praticamente inexplorados os

mecanismos envolvidos nas respostas morfo-/fisiológica, comportamental, metabólica e genética nessa escala.

Em um dos poucos estudos que exploraram a resistência de estruturas vivas a  $10^5$  x g, Beams e King (1934) avaliaram o efeito da exposição de células da ponta da raiz de plantas de feijão a 400.000 x g por cerca de 20 minutos. Posteriormente, as células foram coradas por impregnação osmótica e a estratificação dos componentes celulares foi analisada (BEAMS & KING, 1934). Os mesmos pesquisadores também realizaram análises similares com ovos de nematóides (BEAMS & KING, 1936a). Nesses ensaios eles expuseram ovos do nematoide Ascaris suum a 400.000 x g durante 1 hora. Como parâmetro para avaliar a viabilidade após a ultra aceleração foi observada a capacidade de divisão das células dos ovos centrifugados. Após 48h, 90% dos ovos possuíam células que haviam se dividido ao menos uma vez (BEAMS & KING, 1936a). Segundo os mesmos autores, a morte de grande parte dos organismos quando submetidos a um estresse de tamanha magnitude era decorrente de danos físicos e estruturais, que não acometiam os ovos de Ascaris devido à proteção mecânica fornecida pela casca. Além da escassez de estudos avaliando condições da ordem de  $\geq 10^5$  x g, a ampla maioria deles, como exemplificado pelos trabalhos de BEAMS e KING (1934, 1936a), se limitou a investigar o padrão de estratificação de componentes e organelas celulares após a centrifugação ou realizar análises de viabilidade superficiais. Além disso, a imensa maioria deles analisou estruturas como ovos, cistos e não o organismo como um todo.

Dentre as exceções a esse padrão de análise, encontra-se o estudo realizado por Kwon e Oono (1992), no qual caules de arroz (*Oryza sativa*) foram expostos à 450.000 x g durante 6 h e verificou-se que essa exposição resultava na ativação de RNAs mensageiros e na modificação de proteínas, sugerindo que haviam genes nesse organismo capazes de responder à essa magnitude de estresse gravitacional (KWON & OONO, 1992).

Recentemente, os estudos de exposição a condições de hipergravidade têm se voltado para a mensuração da atividade reprodutiva de extremófilos e extremo-tolerantes a fim de avaliar a possibilidade de organismos terrestres se reproduzirem em condições de hipergravidade. Vasanthan e colaboradores (2017), por exemplo, demonstraram que a exposição do tardígrado *Hypsibius dujardini* a condições de hipergravidade entre 3.421 e 16.060 x g durante apenas 1 minuto ocasionava um decréscimo da viabilidade e da taxa de oviposição proporcional ao aumento da força gravitacional aplicada. No entanto, outros estudos têm demonstrado que alguns organismos são capazes de se proliferar em condições de hipergravidade muito superiores às testadas por Vasanthan e colaboradores (VASANTHAN, 2017).

Deguchi e colaboradores (2011), por exemplo, demonstraram que as bactérias P. denitrificans e E. coli são capazes de tolerar 403.627 x g (DEGUCHI et al. 2011). No entanto, essa análise foi ainda mais longe ao demonstrar que essas bactérias são capazes não apenas de resistir a mais de 400.000 x g como também de se proliferar nessas condições, o que aponta para a possibilidade de organismos terrestres se reproduzirem em condições de hipergravidade extraterrestres.

Nesse contexto, Gao e colaboradores (2013) obtiveram dados ainda mais impressionantes, ao testar a resistência da alga extremófila unicelular *Chlamydomonas sp* a condições de 670.000 x g. Nesse estudo, os autores expuseram esse organismo a condições de gravidade variando de 110 a 670.000 x g e analisaram a influência desse espectro de hipergravidade em alguns parâmetros fisiológicos (*e.g.* viabilidade, taxa de reprodução, expressão gênica e eficiência de fotossíntese). Incrivelmente, foi observada divisão celular mesmo após a exposição a 670.000 x g, evidenciando a preservação de seu potencial reprodutivo. Esse é o maior valor de força g testado em um organismo vivo do qual temos conhecimento (GAO et al. 2013).

#### 1.4.3. Resposta de C. elegans ao estresse gravitacional

A responsividade de nematoides aos mais diversos tipos de estresse (*e.g.* elétrico, térmico, mecânico, químico, luminoso, magnético) tem sido caracterizada em diversos estudos (OKUMURA; TANAKA; YOSHIGA, 2013; RIGA, 2004). No entanto, apesar dos esforços de vários pesquisadores, a resposta desses organismos à gravidade ainda não está completamente elucidada (BARRACLOUGH & FRENCH, 1965; CROFTON, 1954; KALICHAMY et al. 2016; KIM et al. 2007; OKUMURA; TANAKA; YOSHIGA, 2013).

Inicialmente, alguns experimentos seminais realizados por Beams & King (1936a) expuseram nematoides a hipergravidade e demonstraram a sobrevivência de células embrionárias após a exposição a  $10^5 \times g$ , o que sugeriu que esses organismos poderiam apresentar mecanismos de ajuste fisiológico a alterações na gravidade. Os primeiros estudos que investigaram, de forma específica, a resposta a gravidade em nematoides identificaram uma provável resposta gravitática negativa em algumas espécies parasitas; porém, análises adicionais caracterizaram esse movimento apenas como uma migração aleatória (BARRACLOUGH & FRENCH, 1965; CROFTON, 1954). O primeiro registro fidedigno de gravitaxia negativa foi observado no nematoide do vinagre, *Turbatrix aceti* (CROLL, 1970,

PETER, 1952). Posteriormente esse mesmo comportamento gravitático foi observado em larvas *dauer* de *Caenorhabditis japonica* (OKUMURA; TANAKA; YOSHIGA, 2013).

Em relação à espécie modelo *C. elegans*, a gravipercepção se dá por meio de uma transdução de sinais emitidos por neurônios sensoriais após esses serem sensibilizados por um estresse mecânico (estiramento ou toque) provocado por variações na gravidade. No entanto, pouco se sabe acerca dos processos bioquímicos e genéticos envolvidos nessa percepção (HERMAN, 1996; LEE et al., 2012). Nesse contexto, Kim e colaboradores (2007) demonstraram a importância do canal de sódio epitelial DEG/ENAC, do neurotransmissor serotonina e do fator de transcrição DAF-16/FoxO na resposta genética de *C. elegans* em condições de hipergravidade de  $10^2 \times g$  (Figura 4).

Recentemente, a influência da hipergravidade sobre a fisiologia muscular de *C. elegans* foi analisada por Kalichamy e colaboradores (2016), que demonstraram que a exposição a 10 x *g* afeta o desenvolvimento das projeções axonais dos neurônios motores que inervam a musculatura corporal de *C. elegans* (KALICHAMY et al. 2016). Por outro lado, outras análises demonstraram que a hipergravidade de 10 x *g* não é capaz de afetar a locomoção ou a capacidade reprodutiva de *C. elegans* (QIAO et al. 2013). A resilência desse nematoide à hipergravidade também foi observada por Saldanha e colaboradores (2016), os quais verificaram que a exposição de *C. elegans* a condições de até 112 x *g* por 12 h não afetava de forma significatica a sua viabilidade, mobilidade, oviposição, pulsação faríngea e expectativa de vida.

Além disso, Sasagawa e colaboradores (2003) demonstraram que mesmo após exposição a 200 x g os ovos de *C. elegans* eclodiram normalmente, apresentando apenas algumas modificações em função dessa exposição. No entanto, até onde temos conhecimento, nenhum ensaio a respeito da tolerância de *C. elegans* a valores de hipergravidade >  $1,6 \times 10^3 x$ g foi realizado (JOHNSON & NELSON, 1991). Ademais, os estudos mais recentes utilizando esse nematoide modelo se limitaram a expor esses vermes a valores de até  $10^2 x g$ (KALICHAMY et al. 2016; KIM et al., 2007; QIAO et al. 2013; SALDANHA *et al.*, 2016; SASAGAWA et al. 2003). Dessa forma, apesar de *C. elegans* apresentar algumas modificações nos neurônios motores em função da exposição à hipergravidade (KALICHAMY et al. 2016), existem indícios de que esse nematoide apresenta certa resiliência à hipergravidade, podendo potencialmente resistir a magnitudes de estresse gravitacional maiores do que as aplicadas até o presente momento (SOUZA; CARLI; PEREIRA, 2017).



**Figura 4. Esquema ilustrativo dos resultados obtidos por Kim e colaboradores (2007).** A resposta genética de *C. elegans* à hipergravidade de 100 x *g* envolve o canal de sódio epitelial DEG/ENAC, o neurotransmissor serotonina e o fator de transcrição DAF-16.

#### 1.5. Genes responsivos à gravidade em plantas

Os canais responsivos ao estresse mecânico (estiramento ou toque) como os descritos em *C. elegans* também estão relacionados à resposta a gravidade em organismos espalhados por toda a árvore da vida. Em plantas, por exemplo, as vias relacionadas a gravipercepção estão bem caracterizadas e foi demonstrado que o bloqueio de canais ativados por estiramento influencia os efeitos fenotípicos causados pela exposição à hipergravidade (SOGA et al., 2005).

As vias de gravitropismo (*i.e.*, de crescimento em resposta a estímulos da gravidade) em plantas são amplamente estudadas em espécies modelo como *Nicotiana benthamiana* (COLLINGS et al. 2001) e *Arabidopsis thaliana* (SEDBROOK et al. 1998, 1999). Em grande parte desses estudos tem sido dada especial atenção à auxina, um hormônio vegetal presente em todos os tecidos da planta. Interessantemente, a distribuição desse hormônio na raiz e no caule é reorientada de acordo com o campo gravitacional ao qual a planta está exposta, determinando assim a direção do crescimento do caule e das raízes em resposta à gravidade (PERRIN et al. 2005, SWARUP et al. 2005). No intuito de desvendar a ação da auxina na gravitaxia (*i.e.*, orientação gravitacional) de plantas, os fenótipos resultantes de diversas mutações em genes relacionados à via da auxina têm sido analisados.

Sedbrook e colaboradores (1998, 1999), por exemplo, caracterizaram mutações de um gene relacionado com a ação da auxina na gravipercepção denominado *ARG1* (*Altered Response to Gravity 1*). Eles observaram que essas mutações estavam relacionadas a defeitos

no gravitropismo da raiz e do hipocótilo. Por meio da análise dos mutantes foi possível constatar que esse gene codifica uma proteína que interage com o citoesqueleto e é essencial para o transporte de auxina durante a resposta à gravidade. Posteriormente, outros genes similares a *ARG1* foram identificados: o *ARL1* (*Altered Response to Gravity 1-Like 1*) e o *ARL2* (*Altered Response to Gravity 1-Like 2*). Assim como foi observado em *ARG1*, os mutantes de *ARL2* apresentaram alterações no gravitropismo da raiz e do hipocótilo; como esperado, verificou-se que ambos os genes estão relacionados com a mesma via de transdução do sinal gravitacional. Ademais, a análise dos mutantes de *ARL1* também indicou que ele possui função análoga aos seus parálogos *ARG1* e *ARL2* (GUAN et al. 2003).

Diversos outros genes de plantas são amplamente estudados para compreender as vias da resposta à gravidade em plantas como: *AUXI (Auxin influx permease)* (STREET et al. 2016), *EIR1 (Auxin transport protein EIR1)* (LUSCHNIG et al. 1998), *AXR2 (auxin-responsive protein IAA7)* (MAI et al. 2011), *EXGT (Endo-xyloglucan transferase)* (CAMPBELL & BRAAM, 1999), *PALAXI (Putative auxin influx carrier protein)* (HOYEROVÁ et al. 2008), *PILS (Putative auxin transport facilitator protein)* (BÉZIAT et al. 2017), *RGR1 (Reduced root gravitropism/Auxin Response 4)* (MULLEN et al. 1998), *SGR1 (Shoot Gravitropism 1)*, *SGR2 (Shoot Gravitropism 2)* (FUKAKI et al. 1996), *SGR4 (Shoot Gravitropism 4)* (YAMAUCHI et al. 1997), *SGR7 (Shoot Gravitropism 7)* (KATO et al. 2002) e *TWD1 (Twisted Dwarf 1)* (KADAM et al. 2014). A elucidação da função de cada um desses genes auxilia a compreender os mecanismos de gravipercepção não só em plantas como também em outros organismos pois, notavelmente, muitos desses genes anteriormente citados possuem homólogos em diversos metazoários (SILADY et al. 2004, 2008).

#### 1.6. Hipótese e Justificativa

Considerando os resultados obtidos com o nematoide *P. superbus*, levantamos a hipótese de que *C. elegans* é resistente a 400.000 x g e possui genes envolvidos no gravitropismo/gravipercepção os quais são homólogos aos encontrados em plantas e potencialmente responsíveis à hiperaceleração.

Caso confirmadas essas premissas, *C. elegans* poderá ser utilizado como um novo modelo para o estudo dos efeitos da hipergravidade extrema sobre organismos multicelulares, o que contribuirá de maneira singular para o campo da Astrobiologia - o estudo da origem, distribuição e evolução da vida no universo.



#### **2. OBJETIVOS**

#### 2.1. Objetivo geral

Testar a tolerância de *C. elegans* a regimes de hipergravidade e caracterizar genes associados ao gravitropismo/gravipercepção nesta espécie.

#### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar a viabilidade, morfologia, desenvolvimento e comportamento de *C. elegans* submetido à hipergravidade;

2.2.2. Avaliar o perfil metabólica de C. elegans ao longo do espectro de hipergravidade;

2.2.3. Avaliar a expressão do gene dnj-16 em resposta a hipergravidade;

2.2.4. Caracterizar a estrutura do gene *dnj-16*;

2.2.5. Avaliar as hipóteses de homologia, convergência e transferência gênica horizontal (TGH) como explicações para a origem do gene *dnj-16*.
# <u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>

#### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1. Linhagem de C. elegans

A linhagem de *C. elegans* utilizada nos experimentos foi a N2 Bristol (DION; BRUN, 1971). Os vermes N2 Bristol utilizados em nosso laboratório se originaram a partir de amostras gentilmente cedidos pelo nosso colaborador Dr. Alan Tunnacliffe da Universidade de Cambridge, Inglaterra.

As populações de *C. elegans* utilizadas nos experimentos foram mantidas no escuro, a 20°C, em placas NGM ágar (*Nematode Growth Medium* - 3 g NaCl, 17 g Ágar, 2,5 g peptona, 975 mL de água ultrapura, 1 mL CaCl<sub>2</sub> 1 M, 1 mL colesterol em etanol 5 mg/mL, 1 mL MgSO<sub>4</sub> 1 M, 25 ml tampão KPO<sub>4</sub> 1 M) contendo uma camada de bactérias *E. coli* (OP50). Momentos antes do esgotamento da camada de bactérias pela população de *C. elegans* presente na placa, uma amostra desses vermes era transferida para uma nova placa contendo uma camada intacta de bactérias, tomando-se assim o devido cuidado para não serem utilizados vermes em fome nos experimentos.

#### 3.2. Determinação da viabilidade

Para a mensuração da viabilidade os vermes foram expostos ao corante eritrosina B [0,4% w/v em tampão M9 (22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 22 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 85 mM NaCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>)] por 1h e depois foram lavados três vezes com tampão M9. Esse ensaio é efetivo para mensurar a viabilidade dos vermes, pois as células de indivíduos mortos perdem a permeabilidade seletiva, permitindo a entrada do corante e a subsequente distinção entre vivos (não-corados) e mortos (corados) (Apêndice II, Figura 1). A viabilidade foi determinada de acordo com a seguinte fórmula: número de vermes não corados x 100 / número total de vermes.

#### 3.3. Sincronização

A manutenção de *C. elegans* em placas de NGM ágar naturalmente gera populações mistas, *i.e.*, contendo ovos, larvas L1, L2, L3, L4 e indivíduos adultos. A realização de experimentos controlados demanda populações homogêneas (*i.e.*, enriquecidas em um estágio específico). Neste sentido, populações mistas de *C. elegans* foram submetidas ao processo de sincronização via *bleaching* para os experimentos de desenvolvimento e MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Resumidamente, as populações mistas foram expostas a uma solução de *bleaching* (NaOH 1%;

NaClO 30%) durante 10 min, a qual desintegra os vermes, deixando viáveis apenas os ovos. Após esse período foram realizadas três lavagens com água destilada intercaladas com centrifugações a 2.000 x g durante 30s. Os ovos foram depositados em placas de NGM ágar contendo bactérias OP50 e deixados a 20°C no escuro. Após 14h as larvas L2 das placas foram coletadas, lavadas e utilizadas nos experimentos.

#### 3.4. Grupos experimentais

Os experimentos foram realizados, em sua maioria por três grupos: Controle Negativo 1 (CN1), Controle Negativo 2 (CN2) e Grupo Experimental (GE). CN1 foi composto por vermes não submetidos à centrifugação e mantidos à temperatura ambiente por 1 h (*i.e.*, 1 x g e  $\sim$ 20°C). CN2 foi composto por vermes não centrifugados e mantidos resfriados por 1 h (*i.e.*, 1 x g e  $\sim$ 20°C). GE foi composto por vermes centrifugados a 400.000 × g durante 1h a 4°C. No experimento de MTT, o grupo GE também incluiu outras condições de hipergravidade (*i.e.*, 50, 100, 1.000, 10.000 e 100.000 x g) durante 1h a 4°C.

#### 3.5. Ensaios de hipergravidade

Condições de elevada força g (hipergravidade) foram alcançadas por meio de centrifugação a 4°C por 1 h. Os ensaios foram realizados em centrífugas Eppendorf modelos: 5417R (50 e 1.000 x g); 5415R (100 x g) e 5403 (10.000 x g), todas do Depto. de Biologia, FFCLRP USP. As ultracentrifugações a 100.000 e 400.000 x g foram realizadas na ultracentrífuga de alto rendimento Optima MAX-XP - Beckman Coulter (Depto. de Bioquímica, FMRP USP). Após a inserção das amostras na ultracentrífuga, o vácuo foi ligado e a centrifugação teve início apenas quando as condições ideais foram atingidas (4°C e 1,34 Pascal dentro na câmara de centrifugação, não dentro no rotor).

#### 3.6. Aspectos físicos

#### 3.6.1. Análise morfológica e comportamental

Para a análise do efeito da ultra aceleração no comportamento de *C. elegans* os indivíduos foram analisados logo após a ultracentrifugação (dentro de um período máx. de 60 min. após o experimento). A análise ocorreu por meio da câmera digital DCM800 acoplada ao microscópio de luz invertida Labomed TCM400.

Com auxílio do software Scope Photo foram obtidas imagens e vídeos que permitiram a análise morfológica e comportamental de *C. elegans* nas condições experimentais. Os parâmetros avaliados na análise morfológica de *C. elegans* se limitaram a alterações visíveis ao microscópio de luz como a estrutura geral da faringe, a integridade da cutícula e dos ovos e as dimensões dos ovos e dos indivíduos dos diferentes estadios de desenvolvimento. Já as análises comportamentais avaliaram os seguintes parâmetros: (i) padrão espacial de locomoção, (ii) letargia ou dificuldade de locomoção, (iii) presença de contração muscular descontrolada (*twitching*) e (iv) presença de movimentação do indivíduo ao redor do seu próprio eixo corpóreo (*rolling*) (Apêndice III, Figuras 1 e 2).

#### 3.6.2. Análise do desenvolvimento

Para a análise de desenvolvimento foram utilizados ~30 larvas L2 (por replicata técnica) de cada um dos grupos (CN1, CN2 e GE) descritos no item 3.4. Ao término da exposição às condições experimentais os vermes de cada um dos grupos foram depositados em placas NGM ágar contendo bactérias OP50. Este procedimento foi conduzido em triplicatas técnicas e biológicas. As placas foram deixadas a 20°C durante 10 dias no escuro e após esse período foram mensurados: (i) a viabilidade e o (ii) percentual de crescimento populacional (número total final de vermes x 100 /número de vermes inicialmente plaqueados). Para se estimar com precisão o crescimento populacional os números exatos de vermes inicialmente plaqueados em cada um dos experimentos e ao longo dos 10 dias de experimento foram contabilizados.

#### **3.7.** Aspectos moleculares

#### 3.7.1. Análise de expressão gênica via RT-qPCR

Para a análise de expressão gênica foram utilizadas larvas L2 sincronizadas em apenas duas condições CN2 e GE. Os níveis de expressão do gene *dnj-16* (homólogo ao *ARG1*) foi analisado por meio do sistema SuperScript® III One-Step RT-qPCR. Como controle endógeno foi utilizado o gene *Y45F10D.4* devido à notória constância de sua expressão ao longo do desenvolvimento de *C. elegans*.

A quantificação relativa dos níveis de transcritos do gene de interesse por qPCR foi realizada utilizando-se a metodologia SYBR® Green em um aparelho termociclador StepOne<sup>™</sup> Real Time PCR System (Applied Biosystems). Foram desenhados *primers* específicos para o gene de interesse e para o gene endógeno normalizador (Tabela 1). A normalização foi realizada utilizando a média dos valores de Ct do gene *Y45F10D.4*. Todos os

*primers* tiveram a eficiência validada após a construção de uma curva padrão com cinco séries de diluição de cDNA. Para cada reação de amplificação foi utilizado um volume final de 20  $\mu$ l [sendo: 10  $\mu$ l de Power SYBR® Green PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems); 0,8  $\mu$ l (10  $\mu$ M) de cada primer (senso e antissenso); 6,4  $\mu$ l de água deionizada esterilizada e uma alíquota de 2  $\mu$ l de cDNA diluído (1:5/v:v)] e foram realizadas em triplicatas. Após a fase de amplificação, uma curva de dissociação foi realizada para assegurar que somente um fragmento estava sendo amplificado. Os valores de Ct foram transformados em valores de quantificação relativa usando o método comparativo de Ct de acordo com Pfaffl (2001).

Tabela 1. Sequência nucleotídica dos primers utilizados na análise de RT-qPCR.

Canag	Primers (Iniciadores)				
Genes	Forward (senso)	Reverse (antissenso)			
<i>Y45F10D</i> (normalizador)	5' AAGTTTGCGTTGCCAGCGG 3'	5' CGTCGACTCGAATCTGCAAT 3'			
dnj-16	5' CAACTCCAGGAGATCAACCA 3'	5' AACTCTTCCTGAGCATGAGC 3'			

#### 3.7.2. Mensuração da atividade metabólica

Para a mensuração da atividade metabólica de *C. elegans* durante a centrifugação foi utilizado o ensaio de MTT segundo James e Davey (2007) com algumas modificações. Inicialmente foram separadas ~150 larvas L2 em 100  $\mu$ L de tampão M9. Posteriormente foram adicionados 100  $\mu$ L de solução de MTT (10 mg/mL) e imediatamente a seguir os tubos foram submetidos às diferentes condições de hipergravidade (50, 100, 1.000, 10.000, 100.000 e 400.000 x g) durante 1h a 4°C.

Após cada experimento os vermes foram imediatamente imersos em N<sub>2</sub> líquido a fim de interromper a metabolização do MTT. Posteriormente as soluções contendo os vermes foram centrifugadas a 500 x g e o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados 200  $\mu$ L de DMSO a cada um dos tubos e após 1h, 100  $\mu$ L da solução foram coletados e transferidos para uma placa de 96 poços para análise por meio do espectrofotômetro Epoch Biotek, utilizando o programa Gen5 2.06.

Os resultados foram obtidos por meio de uma leitura de absorbância a 575 nm (JAMES E DAVEY, 2007). Foram realizadas seis replicatas técnicas para cada um dos tratamentos (CN1, CN2 e as 6 condições de hipergravidade). Como controle foram analisadas provas em

branco apenas com o DMSO. A comparação entre as diversas forças g foi realizada por meio de uma normalização que levou em conta os períodos maiores de aceleração e desaceleração envolvidos na exposição a 100.000 e 400.000 x g.

#### **3.8.** Aspectos evolutivos

## 3.8.1. Busca em *C. elegans* por homólogos de genes de plantas associados ao gravitropismo

Foi realizada uma busca (tBLASTn; vide apêndice IV e V sobre os programas BLAST utilizados) tendo como isca sequências proteicas de plantas (Tabela 2) relacionadas ao gravitropismo contra *C. elegans* (*Organism*) com o intuito de se encontrar genes responsivos à gravidade nesse nematóide. Essa busca foi realizada contra o banco de dados de ref-seq RNA (Tabela 3). Os parâmetros do algoritmo utilizado nessas buscas foram: *Max target sequences* =100; *Expect threshould*=10; *Word size:*6; *Max matches in a query range*=0; *Matrix: BLOSUM62; Gap Costs*= *Existence:* 11 *Extension:* 1; *Compositional adjustments*=*Conditional compositional score matrix adjustment; Filter*=*Low complexity regions* (Tabela 3). Os códigos das sequências nucleotídicas e proteicas utilizadas nas análises *in silico* desse trabalho se encontram na Tabela 2.

Organismo	Gene		CDS	Proteína	
	Nome	Código	Código	Nome	Código
A. comosus	dnaJ 16	OAY79231.1			
A. lyrata					XM_021031567.1
A. thaliana	ARG1	NC_003070.9 (2563168925634780 NC_003070.9	NM_105508.4	ARG1	OAP16380.1
A. thaliana	ARL1	(85290648532262) NC 003070 9	NM_102258.6	ARL1	NP_173822.2
A. thaliana	ARL2	(2208068922086845)	NM_001333873.1	ARL2	NP_176206.2
A. thaliana	TWD1		NM_062938.3		
A. thaliana	ipla-1		NM_001129151.2		
A. thaliana	act 2		NM_001338359.1		
A. thaliana	H4		NM_001345379.1		
A. thaliana				lon protease 2	NP_568675.1
A. thaliana				Leucine carboxyl methyltransferase	NP_171712.2
A. thaliana				Chaperone protein htpG family protein	NP_178487.1
A. thaliana				protein disulfide isomerase precursor-like	AAM65262.1
A. thaliana				5'-3' exonuclease family protein	NP_001154740.1
A. thaliana				oligouridylate binding protein, putative	AAM65229.1
A. thaliana				AXX17_AT5G12950	OAO96069.1
A. thaliana				AXX17_AT5G18330	OAO95015.1
A. thaliana				PEPKR2	OAP17261.1
A. thaliana				Unknown protein, partial	AAL24306.1
A. thaliana				aldehyde oxidase 4	NP_563711.1

Tabela 2. Código dos genes, CDS e proteínas utilizados nas buscas via BLAST para a análise da origem, estrutura e função do gene dnj-16 de C. elegans.

A. thaliana	 	 unknown, partial	ABK28333.1
A. thaliana	 	 PTEN1	OAO94204.1
A. thaliana		Protein with RING/U-box and TRAF-like domain	NP_194517.1
A. thaliana	 	 proliferating cellular nuclear antigen 1	NP_172217.1
A. thaliana	 	 26S proteasome subunit RPN6a, partial	AAP86664.1
A. thaliana	 	 organic cation/carnitine transporter4	NP_188702.2
A. thaliana		FTSH protease 4	NP_565616.1
A. thaliana		VPS11	OAP08837.1
A. thaliana	 	 putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AAO22684.1
A. thaliana	 	 Zn-dependent exopeptidases superfamily protein	NP_176909.3
A. thaliana		GR	OAP01378.1
A. thaliana		JUMONJI 14	NP_193773.2
A. thaliana		SUMO-activating enzyme 2	NP_179742.2
A. thaliana	 	 putative GPI-anchor transamidase	AAM61446.1
A. thaliana		SNF2	NP_001326839.1
A. thaliana		anti- silencing function 1b	NP_198627.1
A. thaliana		glucosidase 1	NP_176916.2
A. thaliana	 	 ARG1-like 1	NP_173822.2
A. thaliana		damaged DNA binding protein 1B	NP_193842.1
A. thaliana		Stabilizer of iron transporter SufD	NP_175274.1
A. thaliana		lon protease 2	NP_568675.1
A. thaliana		Leucine carboxyl methyltransferase	NP_171712.2
A. thaliana	 	 Chaperone protein htpG family protein	NP_178487.1
A. thaliana		protein disulfide isomerase precursor-like	AAM65262.1
A. thaliana		5'-3' exonuclease family protein	NP_001154740.1
A. thaliana		oligouridylate binding protein, putative	AAM65229.1
A. thaliana		hypothetical protein AXX17_AT5G12950	OAO96069.1

A. thaliana				hypothetical protein AXX17_AT5G18330	OAO95015.1
A. thaliana				PEPKR2	OAP17261.1
A. thaliana				Unknown protein, partial	AAL24306.1
A. thaliana				aldehyde oxidase 4	NP_563711.1
A. thaliana				unknown, partial	ABK28333.1
A. thaliana				PTEN1	OAO94204.1
A. thaliana				Protein with RING/U-box and TRAF-like domain	NP_194517.1
A. thaliana				proliferating cellular nuclear antigen 1	NP_172217.1
A. thaliana				26S proteasome subunit RPN6a, partial	AAP86664.1
A. thaliana				organic cation/carnitine transporter4	NP_188702.2
A. thaliana				FTSH protease 4	NP_565616.1
A. thaliana				VPS11	OAP08837.1
A. thaliana				putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AAO22684.1
A. thaliana				Zn-dependent exopeptidases superfamily protein	NP_176909.3
A. thaliana				GR	OAP01378.1
A. thaliana				JUMONJI 14	NP_193773.2
A. thaliana				SUMO-activating enzyme 2	NP_179742.2
A. thaliana				putative GPI-anchor transamidase	AAM61446.1
A. thaliana				SNF2 domain-containing protein	NP_001326839.1
A. thaliana				anti- silencing function 1b	NP_198627.1
B. rapa				dnaJ 16	XP_009115474.1
C. annum	dnaJ 16		XM_016692443.1		
C. brenneri				CBN-DNJ-16 protein	EGT45655.1
C. briggsae				CBR-DNJ-16	XP_002642541.1
C		NC_003281.10	NIM 0012(70(1.1	$4\pi (270 - 1)$	NID 001254901 1
C. elegans	anj-10	(41912414193138)	NM_001267961.1	anj-10(3/8 aa)	NP_001254891.1
C. elegans	dnj-16	NC 003281 10		dnj-16 (395 aa)	NP_001254890.1
C. elegans	xbp-1	(41939834195117)			

C. elegans				sid-1	CCD63011.1
C. elegans	act-1		NM_073418.5		
C. elegans	H4		NM_064495.1		
C. elegans				DNA damage-binding protein 1	CAA92824.2
C. elegans				Protein argonaute	NP_001257239.1
C. elegans				dnj-16	NP_001254891.1
C. latens				FL83_07286, partial	OZG18401.1
C. nigoni				B9Z55_011310	PIC39710.1
C. remanei			XM_003095896.1	CRE-DNJ-16	XP_003095944.1
C. chinense				dnaJ 16	PHU02772.1
D. carota				dnaJ 16	XP_017215563.1
E. salsugineum				EUTSA_v10007684mg	XP_006416027.1
G. max			XM_006572954.2		
G. max	act-1		XM_006575146.2		
G. max	H4		XM_003521287.3		
H. sapiens				DNAJB6	CAG38529.1
H. brasiliensis				dnaJ 16-like	XP_021635850.1
J. curcas				dnaJ 16	XP_012092030.1
J. regia				dnaJ 16-like	XP_018824403.1
L. angustifolius				dnaJ 16-like	XP_019445496.1
M. domestica				dnaJ 16	XP_008389585.1
M. truncatula				DnaJ	XP_003613368.1
	PITG_1912, PITG_1912				
P. infestans	PITG 19129	NW_003303684.1			
P. parasitica	INRA-310	NW_008649063.1		PPTG_17947	XP_008914163.1
P. parasitica	s T30-4 supercont1.75	NW_003303684.1			
P. parasitica					(XP_008914162.1)

P. parasitica		 		$(\mathbf{V}\mathbf{D}, 0.08014164, 1)$
P. parasitica				(AP_008914104.1)
		 		(XP_008914165.1)
P. parasitica		 		(XP 008914167.1)
P. parasitica		 		$(\mathbf{V}\mathbf{P}, 0.09014170, 1)$
				(XP_008914170.1)
P. sojae		XM_009521304.1		
P. sojae	act-1	 XM_009520581.1		
P. sojae	H4	 XM_009530461.1		
P. vulgaris		 	PHAVU_002G075800g	XP_007157511.1
P. persica		 	dnaJ 16 isoform X1	XP_007222706.1
<i>P. x</i>				
bretschneideri			dnaJ 16	XP_009360453.1
R. sativus		 	dnaJ 16	XP_018486897.1
S. lycopersicum		XM_004238670.3	dnaJ 16	XP_004238718.1
S. bicolor			dnaJ 16	XP_002454307.1
T. subterraneum			TSUD_239430	GAU20749.1
V. radiata			dnaJ 16 isoform X1	XP_014492245.1
V. vinifera			VITISV_024054	CAN74067.1

#### 3.8.2. Caracterização do gene dnj-16

Com o intuito de caracterizar o gene *dnj-16* foram feitas análises comparativas com o seus homólogos em plantas (*ARG1*, *ARL1* e *ARL2*) utilizando o software Clustal Omega (<u>https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</u>) (LI et al. 2015; SIEVERS et al. 2011; MCWILLIAM et al. 2013). Assim, foram alinhadas as proteínas dnj16 (isoforma de 378 aa) dnj-16 (isoforma de 395 aa), ARG1, ARL1 e ARL2. Esse alinhamento permitiu a análise comparativa de três de seus domínios proteicos ('DnaJ', 'transmembrana' e '*coiled coil'*), assim como mutações neste gene já descritas na literatura (GLEESON et al. 2012; GUAN et al. 2003; SEDBROOK et al. 1998). Além disso, foi realizado o alinhamento de parte dos domínios DnaJ e transmembrana de dnj-16 com o seu homólogo em humanos (DNAJB6) e em 10 espécies de plantas (*Capsicum anuum, Prunus persica, Solanum lycopersicum, Lupinus angustifolius, Juglans regia, Vigna radiata, Medicago truncatula, Jatropha curcas, Phaseolus vulgaris, Brassica rapa*) (Tabela 2).

### 3.8.3. Predição dos domínios transmembrana e *coiled coil* das proteínas dnj-16, ARG1, ARL1 e ALR2

Após a análise da sequência de aminoácidos dos domínios da proteína dnj-16, foram utilizados softwares preditivos a fim de se verificar se cada um de seus domínios estavam preservados. Inicialmente, os domínios transmembrana das proteínas dnj-16 (378 aa), dnj-16 (395 aa), ARG1, ARL1, ARL2 foram preditos com auxílio do software Phobius (<u>http://phobius.sbc.su.se/</u>) (Käll et al. 2004, 2005, 2007). Como controle foi utilizada a proteína transmembrana sid1 (Tabela 2). A predição foi realizada considerando o resultado estendido com representação gráfica.

Posteriormente, foi realizada a predição do domínio *coiled coil* das proteínas dnj-16 (378 e 395 aa), ARG1, ARL1 e ARL2 com auxílio do software Prabi (<u>https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\_lupas.html</u>) (GUERMEUR et al. 1999; LUPAS, VAN DYKE, STOCK, 1991) e a estrutura tridimensional dessas proteínas foi obtida com auxílio do software Swiss model (<u>https://swissmodel.expasy.org/interactive</u>) (ARNOLD et al., 2006; BIASINI et al., 2014; BIENERT et al., 2017; BORDOLI, 2009; GUEX et al., 2009; KIEFER et al., 2009; KOPP & SCHWEDE, 2006). O software Prabi gera sua

representação gráfica considerando janelas de 14, 21 e 28 aa, que são múltiplos dos heptâmeros de aminoácidos que formam a estutura *coiled coil*.

#### 3.8.4. Rede de interações proteicas de dnj-16 e ARG1

Por meio da utilização do software String (<u>https://string-db.org/</u>) (FRANCESCHINI et al. 2013, 2015; JENSEN et al. 2009; SNEL et al. 2000; SZKLARCZYK et al. 2011, 2015, 2017; VON MERING et al. 2003, 2005, 2007) foram obtidas as redes de interação das proteínas dnj-16 e ARG1. As interações são identificadas por meio de linhas que representam associações baseadas em dados de proximidade genômica, fusões gênicas, co-ocorrência nos genomas, co-expressão, dados experimentais e bioquímicos, associação em banco de dados curados, presença no texto e homologia de proteínas.

#### 3.8.5. Comparação entra as sequências nucleotídicas de dnj-16, ARG1, ARL1 e ARL2

A análise das proteínas dnj-16, ARG1, ARL1 e ALR2 foi acompanhada também do estudo de suas respectivas sequências nucleotídicas. Dessa forma, por meio do software Clustal Omega (<u>https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</u>) (LI et al. 2015; SIEVERS et al. 2011; MCWILLIAM et al. 2013), foi realizado a alinhamento dos nucleotídeos de *dnj-16*, *ARG1*, *ARL1* e *ARL2* (Tabela 2) permitindo a análise das semelhanças e diferenças entre esses genes.

#### 3.8.6. Elaboração de filogenias proteicas e nucleotídicas

Para a elaboração das filogenias foram inicialmente realizadas buscas (BLASTn e BLASTp) a fim de se encontrar sequências nucleotídicas e proteicas homólogas a *dnj-16*. A busca por BLASTp foi realizada utilizando como isca a proteína dnj-16 (378 aa) contra o banco de dados de sequências proteicas não redundantes (nr). O algoritmo utilizado foi *blastp* (protein-protein BLAST) e os parâmetros foram: Max target sequences =100; Expect threshould=1e<sup>-40</sup>; Word size:6; Max matches in a query range=0; Matrix: BLOSUM62; Gap Costs= Existence: 11 Extension: 1; Compositional adjustments=Conditional compositional score matrix adjustment. A busca por BLASTn foi realizada utilizando o CDS da sequência gênica de *dnj-16* contra o banco de dados nucleotídicos (nr/nt). O algoritmo utilizado foi Somewhat similar sequences (blastn) e os parâmetros foram: Max target sequences =100; Expect threshould=1e<sup>-10</sup>; Word size: 11; Max matches in a query range=0;

Match/Missmatch=2,-3; Gap Costs= Existence: 5 Extension: 2; Filter=Low complexity regions; Mask=Mask for lookup table only (Tabela 3).

Para a elaboração das filogenias foram utilizadas apenas o melhor *hit* obtido de cada espécie nas buscas (BLASTp e BLASTn). As sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta "ClustalW Multiple Alignment" (Número de bootstraps: 1000) do software *Bioedit* e a filogenia foi gerada por meio do *MEGA7*. A filogenia produzida representa a história evolucionária da sequência proteica e nucleotídica de *dnj-16* obtida por meio do método "Maximum Likelihood" no modelo Tamura-Nei. A filogenia foi gerada por meio dos algoritmos Neighbor-Join and BioNJ utilizando a abordagem "Maximum Composite Likelihood (MCL)".

Além disso foi realizada uma busca (tBLASTn) utilizando como isca a proteína dnj-16 (378 aa) contra a coleção de nucleotídeos (nr/nt). Os parâmetros do algoritmo utilizado nessas buscas foram: *Max target sequences* =250; *Expect threshould*=1e<sup>-40</sup>; *Word size* : 6; *Max matches in a query range*=0; *Matrix: BLOSUM62; Gap Costs*= *Existence:* 11 *Extension:* 1; *Compositional adjustments*=*Conditional compositional score matrix adjustment; Filter*=*Low complexity region.* Nota: em virtude da natureza diversa dos *hits* (mRNA parcial, cDNA, DNA genômico, etc) gerados a partir dessa busca, não foi elaborada uma filogenia, no entanto os dados foram comparados com os gerados pelo BLASTp e BLASTn previamente descritos.

#### 3.8.7. Análise de TGH via codon usage

A possibilidade das espécies *C. elegans, Glycine max* e *Phytophthora sojae* estarem envolvidas em um evento de TGH que teria originado o gene *dnj-16* de *C. elegans* foi verificada por meio de uma análise da frequência dos códons específicos que codificam os diferentes aminoácidos de *dnj-16*, *ARG1* e os seus homólogos em *Glycine max* e em *Phytophthora sojae*. Para a análise da frequência de cada códon nos genomas e nas sequências nucleotídicas dos organismos previamente citados foram utilizados o banco de dados "*Codon Usage*" (<u>http://www.kazusa.or.jp/codon/</u>) e o programa "Count codon" (*Translation exception table: Standard*), respectivamente. Como controles foram utilizados os genes *act-1* e *hist-4* (Apêndice VI, Tabelas 1-16).

#### 3.8.8. Análise de conservação de sintenia

Para verificar a possível conservação de sintenia entre o gene *dnj-16* e seus genes flanqueadores durante uma eventual TGH foi realizada uma análise (tBLASTx) comparativa entre *C. elegans*, *Phytophthora infestans* e *Glycine max* utilizando (i) a região que envolve 2 genes *upstream* a *dnj-16* (no cromossomo de *C. elegans*, genes R74.10 e R74.11), o próprio gene *dnj-16* e 1 gene *downstream* (*xbp-1*) contra (ii) a região que envolve 2 genes *upstream* à sequência homóloga à *dnj-16* no cromossomo de *Phytophthora infestans* e 1 gene *downstream* a ela (PITG\_19129). Nessa busca foi utilizado o código genético padrão e os parâmetros do algoritmo foram: *Max target sequences* =100; *Expect threshould*=10; *Word size:3; Max matches in a query range*=0; *Matrix:* BLOSUM62; *Filter=Low complexity regions*. Como uma análise complementar foi caracterizada a estrutura (éxons e introns) do gene homólogo à *dnj-16* em *P. parasitica* e dos genes que o flanqueiam. A mesma análise foi realizada para o gene *ARG1* de *A. thaliana*. Ambas as análises se utilizaram das informações contidas no banco de dados do NCBI e do TAIR.

# 3.8.9. Análise do GC% de *dnj-16* (CDS) e das *coding sequences* de *C. elegans, P. sojae* e *G. max.*

Considerando que a análise do conteúdo de GC (%) de sequências nucleotídicas pode lançar luz sobre a origem evolutiva (ROMIGUIER & ROUX, 2017), o conteúdo de GC (GC%) da CDS de *dnj-16* foi confrontado com o "coding GC%" de *C. elegans, P. sojae* e *G. max* (Apêndice VII, Tabela 1). Para o cálculo de GC% de cada um dos genes analisados foi utilizado o software Gene Runner (generunner.net).

#### 3.8.10. Análise das regiões reguladoras do gene dnj-16

Com auxílio do banco de dados do wormbase (<u>http://www.wormbase.org</u>) foi analisada a estrutura do gene *dnj-16* para: (i) identificar íntrons, éxons e possíveis regiões reguladoras e (ii) obter dados de expressão das isoformas (Apêndice VIII, Tabela 1), objetivando testar as hipóteses sobre a origem deste gene (homologia, convergência ou TGH).

Para se identificar a origem da possível região promotora de *dnj-16* (localizado no íntron 1, posição genômica 4.191.280 – 4.191.547) foi realizada uma busca (BLASTn) utilizando como isca a sequência do primeiro íntron de *dnj-16* contra *Phytophthora*. Posteriormente, foram

realizadas outras duas buscas (BLASTn) utilizando a sequência do primeiro íntron de *dnj-16* como isca. A primeira foi realizada contra Plantas (viridiplantae) e a segunda contra a coleção de nucleotídeos (nr/nt) excluindo o gênero *Caenorhabiditis* dos resultados. O algoritmo utilizado nessas buscas foi *blastn*) e os parâmetros foram:

Posteriormente foi investigada a natureza do primeiro éxon de *dnj-16* por meio de uma busca (BLASTp) utilizando como isca os 12 aa (codificados por este éxon) contra sequências proteicas não redundantes (nr), sem haver a especificação de grupos taxonômicos. O algoritmo utilizado foi *blastp (protein-protein BLAST)* e os parâmetros foram: *Max target sequences* =100; *Expect threshould*=10; *Word size:*6; *Max matches in a query range*=0; *Matrix: BLOSUM62; Gap Costs*= *Existence:* 11 *Extension:* 1; *Compositional adjustments*=Conditional compositional score matrix adjustment.

Após a análise do primeiro éxon e do primeiro íntron de dnj-16 foi realizada uma busca por sítios de poliadenilação relacionadas à terminação da transcrição (animais e vegetais) na região 3'UTR de dnj-16. Foi realizada também uma busca por elementos de poliadenilação na provável região promotora de dnj-16. A identificação dos elementos de poliadelinação baseouse em Shen *et al.*, 2008. Após a localização dos sítios, foi elaborado um modelo sintético da região intergênica entre dnj-16 e xbp-1 e da região promotora de dnj-16.

#### 3.8.11. Análise de evolução neutra

A permanência da sequência de *dnj-16* em *C. elegans* após um provável evento de TGH deve ser analisada à luz de teorias evolutivas. Dessa forma, foi realizada uma análise utilizando o *Codon Based Fisher's Exact Test* (z-TEST) e o teste de Tajima para Evolução Neutra. Ambas as análises consideraram as CDS de 3 espécies de nematóides (*C. elegans, C. remanei, C. briggsae*) e três espécies de plantas (*C. annuum, S. lycopersicum, A. thaliana*). Por meio das buscas utilizando o BLAST, foi constatado que as sequências nucleotídicas e proteicas dessas espécies possuem grande similaridade com o gene *dnj-16* de *C. elegans*. Dessa forma, elas foram utilizadas nessas análise. Os nomes completos das espécies utilizadas nessa e nas outras análises desse trabalho, juntamente com suas respectivas abreviações se encontram no apêndice IX.

O z-TEST é um teste seleção que compara o número de mutações sinônimas e nãosinônimas entre diferentes sequências. Esse teste pode ser utilizado para identificar a presença de seleção positiva atuando sobre as sequências (ZHANG et al. 1997). Se essa análise resultar em valores de p<0,05, então a hipótese de evolução neutra (unicamente neutra ou purificadora) é rejeitada. Por outro lado, se o número de mutações sinônimas por sítio for maior do que o de não sinônimas (p=1), será um indicativo de seleção purificadora ao invés de seleção positiva.

O teste de Tajima se baseia na presença de alelos neutros em uma população hipotética que possui tamanho constante e sítios infinitos sem recombinação (TAJIMA, 1989). Nesse teste a variação acumulada em uma sequência é representada pelo letra grega teta ( $\theta$ ). O valor de  $\theta$  é determinado pelo tamanho efetivo da população e pela taxa de mutação. Já a letra grega pi ( $\Pi$ ) representa o parâmetro que é calculado em função do número de diferenças existentes entre duas sequências selecionadas estocasticamente da amostra. Dessa forma a utilização de  $\Pi$  é uma das formas de se calcular  $\theta$ , o qual também pode ser estimado por meio do número de sítios polimórficos presentes nas sequências analisadas (S). Como existem duas formas viáveis ( $\Pi$  e S) para se calcular o valor de  $\theta$ , Tajima (1989) propôs que a diferença (D) entre os resultados de  $\theta$  obtidos por  $\Pi$  e S seriam indicativos de desvios da neutralidade, pois em condições de neutralidade não haveria diferença entre o valor de  $\theta$  obtido por meio dessas duas estimativas (D=0). Por outro lado, valores D negativos (D<0) seriam um indicativo de seleção balanceadora, expansão populacional, eventos fundadores, varredura seletiva, gargalos populacionais ou efeito carona. Por fim, valores de D positivos (D>0) seriam sugestivos da existência de uma seleção direcional (HAMILTON, 2009; TEMPLETON, 2006)

#### 3.8.12. Análise de homologia

A fim de verificar se a identididade e a similaridade observadas entre as proteínas ARG1 e dnj-16 seriam semelhantes às observadas entre outros 'pares de proteínas homólogas *per se*' foram realizadas análises de divergência média de identidade (DMI = 100% - a porcentagem de identidade indicada no BLAST) e a divergência média de similaridade (DMS = 100% - a porcentagem de similaridade indicada no BLAST). Para o cálculo de DMI/DMS de *dnj-16* foram utilizadas 6 pares de proteínas (*ARG1* de *A. thaliana* versus 6 espécies do gênero *Caenorhabditis* (*C. elegans, C. remanei, C. briggsae, C. nigoni, C. brenneri, C. latens*). Para o cálculo de DMI/DMS de proteínas homólogas, 30 sequencias foram comparadas entre *C. elegans* e *A. thaliana*: DNA damage-binding protein 1; Argonauta; Lon Protease; leucine carboxyl methyltransferase 1; Heat Shock Protein; Protein disulfide-isomerase 1; cell death-related nuclease 1; TIA-1/TIAL RNA binding protein homolog; Aminopeptidase-1; Suppressor of organelle fusion 2; MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase mnk-1; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase sig-7; Probable aldehyde oxidase gad-3; Ubiquitin-related modifier 1 homolog;Putative protein phosphatase tag-83; E3 ubiquitin-protein ligase siah-1;Proliferating

cell nuclear antigen; Probable 26S proteasome regulatory subunit rpn-6.2; Putative transporter B0361.11; ATP-dependent zinc metalloprotease YME1 homolog; Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2; Putative endoplasmic reticulum metallopeptidase 1-B; Thioredoxin reductase 1; Lysine-specific demethylase 4; SUMO-activating enzyme subunit uba-2; Putative GPI-anchor transamidase;Helicase ssl-1; Probable histone chaperone asf-1; Mannosyl-oligosaccharide glucosidase (Tabela 2).

#### 3.8.13. Caracterização do domínio COA

Para investigar a presença do domínio COA (característico da enzima *Chlorophyllide a oxygenase*, codificada e localizada em cloroplastos) em espécies de fitoparasitas do gênero *Phytophthora*, realizou-se uma busca (tBLASTn) utilizando como isca uma sequência proteica quimérica formada pela fusão de uma região de *dnj-16* de *C. elegans* contendo o domínio DnaJ (cor vermelha) com o domínio COA de plantas (cor verde):

### VSEMDFYQLLGVEKMASEAEIKSAYRKLALKYHPDRNPNDAHAQEEFKKVSIAY SVLSDPNKRRQYDVSGPSENQLDFEGFDVSEMGGVGRVFGALFSLTIMILHDKV VDVLNPLAREYKSIGTVKKELAGLQEELSKAHQQVHISEARVSTALDKLAHMEE LVNDRL

Os parâmetros do algoritmo utilizado nessas buscas foram: *Max target sequences* =100; *Expect threshould*=10; *Word size:*6; *Max matches in a query range*=0; *Matrix: BLOSUM62; Gap Costs*= *Existence:* 11 *Extension:* 1; *Compositional adjustments*=Conditional *compositional score matrix adjustment; Filter*=Low *complexity regions* (Tabela 3).

A caracterização do domínio COA do gene *dnj-16* de *C. elegans* foi realizada por meio de uma busca (BLASTp) utilizando também como isca a sequência do domínio DnaJ fusionado ao domínio COA de plantas contra sequências proteicas de homólogos de *dnj-16* em 10 espécies de plantas (*Capsicum anuum, Prunus persica, Solanum lycopersicum, Lupinus angustifolius, Juglans regia, Vigna radiata, Medicago truncatula, Jatropha curcas, Phaseolus vulgaris, Brassica rapa*). O algoritmo utilizado foi *blastp (protein-protein BLAST)* e os parâmetros foram: *Max target sequences* =100; *Expect threshould*=10; *Word size:* 6; *Max matches in a query range*=0; *Matrix: BLOSUM62; Gap Costs*= *Existence:* 11 *Extension:* 1; *Compositional adjustments*=Conditional compositional score matrix adjustment (Tabela 3).

Para se testar as hipóteses de TGH via DNA ou RNA foi analisado o número e a distribuição de íntrons e éxons de *dnj-16* e dos seus homólogos em *G. max* e nas espécies do

gênero *Phytophthora* por meio dos dados disponíveis no NCBI. Posteriormente foi realizada também uma busca (BLASTp) usando como isca a proteína dnj-16 (378 aa) de *C. elegans* contra viridiplantae a fim de se verificar se a porção referente ao domínio COA é reconhecida nos padrões de homologia gerados pelo BLAST. O algoritmo utilizado foi *blastp (protein-protein BLAST)* e os parâmetros foram similares ao BLASTp descrito anteriormente.

#### 3.8.14. Análise de sequências homólogas ao domínio DnaJ do gene dnj-16

A fim de complementar as análises anteriores que investigaram a natureza do gene *dnj-16* foi realizada uma busca (tBLASTn) utilizando como isca a sequência de aminoácidos do domínio DnaJ de *dnj-16*, que é o domínio mais conservado dessa proteína, contra a coleção de nucleotídeos (nr/nt) a fim de se verificar se as sequências encontradas nessa busca se concentrariam em grupos taxonômicos compatíveis com a hipótese de TGH ou estariam dispersos nos diversos táxons. Os parâmetros do algoritmo utilizado nessas buscas foram: *Max target sequences* =100; *Expect threshould*=10; *Word size:* 6; *Max matches in a query range*=0; *Matrix: BLOSUM62; Gap Costs= Existence:* 11 *Extension:* 1; *Compositional adjustments=Conditional compositional score matrix adjustment; Filter=Low complexity regions* (Tabela 3).

#### 3.9. Análise estatística

Cada experimento foi realizado em triplicatas biológicas, cada qual constituída por triplicatas técnicas (exceto para MTT - apenas hexaplicata técnica). Para cada replicata técnica foram utilizadas: ~600 vermes nos experimentos de viabilidade ou comportamento, ~150 vermes no experimento de atividade metabólica (MTT), ~30 vermes no experimento de desenvolvimento. Os dados foram analisados usando os testes "One Way ANOVA" seguido de Student Newman tendo como corte p<0,05.

#### **Desenho experimental**



<u>4. RESULTADOS</u>

#### 4. RESULTADOS

#### 4.1. Aspectos físicos

Logo após a centrifugação diversos parâmetros físicos foram analisados, dentre eles a viabilidade. Curiosamente, ela não diminuiu após a exposição a 400.000 x *g, i.e.*, os valores permaneceram praticamente os mesmos observados nos dois controles (CN1 e CN2) (Figura 5). O crescimento populacional mensurado 10 dias após a exposição também não apontou qualquer diminuição significativa (p<0,05) do potencial reprodutivo e da viabilidade dos vermes após a exposição à hipergravidade extrema (Figura 6). Da mesma forma, a análise morfológica (Figura 7) e comportamental (dados não mostrados) não identificaram quaisquer alterações estruturais ou comportamentais grosseiras em *C. elegans*.



Figura 5. Porcentagem de sobrevivência (viabilidade) de *C. elegans* após exposição a diferentes condições experimentais. CN1: vermes em solução M9 a temperatura ambiente (20°C) não centrifugados; CN2: vermes em solução M9 a 4°C (por 1 hora) não centrifugados; GE: vermes em solução M9 a 4°C centrifugados (400.000 x g por 1h). Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas. N° de vermes (população mista) por experimento: 600.



Figura 6. Crescimento populacional (% em relação ao *input*) de *C. elegans* mensurado 10 dias após exposição a diferentes condições experimentais. CN1: vermes em solução M9 a temperatura ambiente (20°C) não centrifugados; CN2: vermes em solução M9 a 4°C (por 1 hora) não centrifugados; GE: vermes em solução M9 a 4°C centrifugados (400.000 x g por 1h). Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas. N° de vermes (larvas L2) no início do experimento: 30.



Figura 7. Imagens dos vermes em placa NGM ágar logo após exposição a diferentes condições experimentais. A. CN1: vermes em solução M9 a temperatura ambiente ( $20^{\circ}$ C) (por 1 hora) não centrifugados. B. CN2: vermes em solução M9 a 4°C (por 1 hora) não centrifugados. C. GE: vermes em solução M9 a 4°C centrifugados ( $400.000 \times g$  por 1h). Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas).

#### 4.2. Aspectos moleculares

No intuito de se identificar possíveis genes relacionados à gravidade em *C. elegans* foi realizada uma busca por sequências homólogas a genes/proteínas conhecidamente responsivos ao gravitropismo em plantas (Tabela 3). O tBLASTn dessas proteínas permitiu encontrar em *C. elegans* correspondentes de três genes de *A. thaliana*: (i) *dnj-16*, (ii) *ipla-1* (*Intracellular PhosphoLipase A - 1*) e (iii) sequência homóloga à *TWD1* (*Twisted Dwarf 1*). Destes, o gene *dnj-16* foi escolhido por apresentar o menor *e-value* e maiores porcentagens de *positivos* e *cobertura* (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado da busca (tBLASTn) em C. elegans por homólogos de alguns genes de plantas associados ao gravitropismo/gravipercepção.

Nome do gene em plantas	Sigla(s) em plantas	Espécie (isca)	Núm. Aces. Isca	Homólogo em <i>C. elegans</i>	Núm. Aces. Presa	E- value	Positivos (%)	Cobertura (%)
Auxin Binding Protein 1	ABP1	A. thaliana	AEE82256.1	não há	-	-	-	-
Auxin influx permeasse	AUXI	A. thaliana	CAA67308.1	não há	-	-	-	-
Auxin transport protein EIR1	EIR1/AGR1/AtPIN2	A. thaliana	BAA97359.1	não há	-	-	-	-
auxin-responsive protein IAA7	AXR2	A. thaliana	AEE76709.1	não há	-	-	-	-
DnaJ-like protein/ Altered Response to Gravity 1	ARG1	A. thaliana	AEE34786.1	dnj-16	٤	4e-57	53%	84%
Endo-xyloglucan transferase	EXGT	Nicotiana tabacum	BAA32518.1	não há	-	-	-	-
Putative auxin influx carrier protein	PALAXI	Prunus avium	CAI05895	não há	-	-	-	-
Putative auxin transport facilitator protein	PILS	Pisum sativum	BAH23798.1	não há	-	-	-	-
Reduced root gravitropism/Auxin Response 4	RGR1	A. thaliana	OAP12897.1	não há	-	-	-	-
Shoot Gravitropism 1	SGR1	A. thaliana	OAP01971.1	não há	-	-	-	-
Shoot Gravitropism 2	SGR2	A. thaliana	OAP18662.1	<i>ipla-1</i> (Intracellular PhosphoLipase A – 1)	NM_001129151.2	2e-32	47%	45%
Shoot Gravitropism 4	SGR4	A. thaliana	Q9SEL6	não há	-	-	-	-
Shoot Gravitropism 7	SGR7	A. thaliana	Q9SZF7	não há	-	-	-	-
Twisted Dwarf 1	TWD1/FKPP42	A. thaliana	Q9LDC0	Uncharacterized protein	NM_062938.3	6e-08	49%	42%

Os resultados dos experimentos de RT-qPCR evidenciaram uma subexpressão significativa (p<0,05) do gene *dnj-16* após o período de hiperaceleração (Figura 8). Ademais, os resultados da análise por MTT apontaram para uma queda do metabolismo em função da exposição à hiperaceleração (50-400,000 x g), o que foi compatível com os resultados de expressão de *dnj-16* previamente descritos. No entanto não houve quedas significativas no valor de OD dentro do espectro de valores de hipergravidade (Figura 9).



**Figura 8.** Expressão relativa do gene *dnj-16* de *C. elegans* após exposição a diferentes condições experimentais. CN2: vermes em solução M9 a 4°C (por 1 hora) não centrifugados; GE: vermes em solução M9 a 4°C centrifugados (400.000 x *g* por 1h). Normalizado por *Y45F10D.4* (controle endógeno). Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas. N° de vermes (larvas L2) por experimento: 1.000-5.000. (\*) Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0.05).



Figura 9. Valores de OD obtidos após a exposição de *C. elegans* a diferentes condições de hipergravidade. CN1: vermes em solução M9 a temperatura ambiente (20°C) não centrifugados; CN2: vermes em solução M9 a 4°C (por 1 hora) não centrifugados. Os experimentos foram realizados em hexaplicata técnica. N° de vermes (larvas L2) por experimento: 600. (\*) Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0.05).

#### 4.3. Aspectos evolutivos

A análise do gene *dnj-16* e do seu homólogo *ARG1* em *Arabidopsis thaliana* abarcou também outros genes similares a *ARG1* encontrados em plantas: o *ARL1* e o *ARL2*. A análise comparativa dos domínios DnaJ, transmembrana e *coiled coil* nessas proteínas apontou para uma semelhança muito grande entre as cinco proteínas analisadas dnj16 (378 aa), dnj-16 (395 aa), ARG1, ARL1 e ARL2 (Figura 10).

Para se verificar se as pequenas alterações na sequência de aminoácidos poderiam explicar uma possível diferença de função entre a proteína dnj-16 e suas homólogas em plantas, foram analisadas as posições das mutações nos genes *ARG1*, *ARL1 e ARL2* descritas na literatua e os seus efeitos fenotípicos (Figura 10, Tabela 5). No entanto, essas mutações não representam as principais diferenças entre as sequências proteicas de *C. elegans* e de plantas, não ajudando a explicar a possível diferença funcional entre essas proteínas.

	А
DNJ-16a	MSKATTPGDQPKVSEMDFYQLLGVEKMASEAEIKSAYRKLALK
DNJ-16b	MV LLFGKRRS SQATSATMSKATT PGDQ PKVSEMDFY QLLGVEKMASEAE I KSAYRKLALK
ARGI ART.1	MDCHRSKSEKKDADKOLBBDDYEVLCVSKDANDQEIKSAYPKLALK
ARL2	MATHSSRSENKDAGEEDELRRRNPYEVLGIPSNSTDOEIKSAYRRMAL
	*
	B C
DNJ-16a	YH PDRN PNDAHAQEE FKKVSIAY SVLSDPNKRRQYDVSGP SENQLDFEGFDVSEMGGV
DNJ-16b	YHPDRNPNDAHAQEEFKKVSIAYSVLSDPNKRRQYDVSGPSENQLDFEGFDVSEMGGV
ARG1	YH PDKNANNP DASEL FKEVAFSY SILS DPEKRRHYDNAG FEALDADGMDME I DLSNLGTV
ARLI	YH PDKTANDPVAADMFKEVTFSYNLLSDPEKRRQFDSAGFEAVEAESQELELDLSSLGAV
ARLZ	***** · · * · **·* · · * · ****
DNJ-16a	GRVFGALFSKLGVPIPTQIVPKVLAQARHICMGQECDVQARQLPPGETVTSSVSKQHAHF
DNJ-16b	GRVFGALFSKLGVPIPTQIVPKVLAQARHICMGQECDVQARQLPPGETVTSSVSKQHAHF
ARG1	NTMFAALFSKLGVPIKTTVSANVLEEAMNGTVTVRPLPIGTSVSGKVEKQCAHF
ARL1	NTVFAALFSKLGVPIKTSVSATILEEALNGRVSVDPLVLGQAVSKKVEKQCAHF
ARL2	NTIFAALFNKLGVQIKTTVSANLLGEALNGTVTTLPLMVGQVVSRKVEKQSAHF
DNJ-16a	YEINIQEEHRKNGVAIIC-KSSSSKFKLVLFDKEGGVR-MIQESGKRGKAGTQADMFF
DNJ-16b	YEINIQEEHRKNGVAIIC-KSSSSKFKLVLFDKEGGVR-MIQESGKRGKAGTQADMFF
ARG1	FGVTISEQQAESGVVVRVTSTAQSKFKLLYFEQDSSGGYGLALQEESEKTGKVTSAGMYF
ARL1	YAVTISEEEVSAGLVCRVESSSKSKFKLLYFDQEANSGLSLALQEDSKRTGKITSAGMYF
ARL2	YSVTLTEEEAQDGLICKVHSSAKNKFKLLYFDQVENGGLSLALQEDSRKTGKLSTAGLYF
DNJ-16a	VPYNVANIQEFNAMKYHLEDKETPLAFHYLDSFEMQTATLLETRKHYIAVYGDNWISDVK
DNJ-16b	VPYNVANIQEFNAMKYHLEDKETPLAFHYLDSFEMQTATLLETRKHYIAVYGDNWISDVK
ARG1	LHFQVYRMDTTVNALAAAKDP-ESAFFKRLEGLQPCEVSELKAGTHIFAVYG <mark>DN</mark> FFKTAS
ARL1	${\tt LGFPVYRLDHTINSMAQAKDP-ETAFFKKLDGFQQCEVTELKAGTHVFAVYGDNFFKNVS}$
ARL2	FGFPVYRFDHRVNSRALSRDP-ETGFFKRLDAFQPFEITELKAGSHVFAVYGDNFFKSVS
DN.T-162	E VSTTFLDVEDSAVEOLNETODTEKSTSTIKKEMLDEOREFTEAKRKVDEAVAKLKVODDT
DNJ-16b	YSITFLEVEPSAVEQLINEIODTEKSISIIKKEMLDFOREFTEAKRKYDEAVAKLKVODDT
ARG1	YTIEALCAKTYEDT-TEKLKEIEAQILRKRNELROFETEYRKALARFOEVTNRYTOEKOT
ARL1	YTIQVLCAAAFTQE-KEDLRSVEAQILTKRAELAKFETEYREVLVQFTDMTSRYAQEMQS
ARL2	YTLEIFSSAPFGNE-KESLRSTEAQIVSKR <mark>TELLKFEAEYHEVFAQFTEMASKCTGEVQE</mark>
	*:::: :::::::::::::::::::::::::::::::::
DIT 16-	F
DNJ-16a	
ARG1	VDELLKORDTTHSTFSVVKTPSGNNLSNGSSSKAOGDES
ARL1	IDELLKORNEIHSAYTTIPLMKRSSSKNRMRKSSFKKAAAKAPAPTEOEEEE
ARL2	IDELLKRRNEICAAYTIFPPTKQGSSKSRSWSKKKSSLLMEPREEG
	::*:*::
DN.T-162	GI.T.CMFK
DNJ-16b	GLLGWFK
ARG1	KGDGDSAGEEGGTENRDKSKRKWFNLNLKGSDKKLG
ARL1	EEEEEEEESSRQKNKKPSTCDKSETLKKKSKWFNLHLKLDKKKPC
ARL2	QURVREEGGVKKKKWYNIQLRQDKKKN-
	*::

Figura 10. Alinhamento dos domínios DnaJ (vermelho), transmembrana (azul) e *coiled coil* (verde) das proteínas dnj16 (378 aa; DNJ-16a), dnj-16 (395 aa; DNJ-16b), ARG1, ARL1 e ARL2. Seis mutações distintas são indicadas: A. *arg1-2* (rachurado verde), B. *arl2-3* (rachurado verde), C. *arl1-4* (rachurado verde), D. *arg1-1* (rachurado verde), E. *arl2-1* (rachurado amarelo), F. *arl2-2* (rachurado verde).

Tabela 4. Características das mutações em ARG1, ARL1 e ARL2 descritas na literatura e seus efeitos no gravitropismo. As mutações indicadas na figura 13 (exceto Arg1-3) são caracterizadas abaixo.

Mutação (sigla)	Тіро	Posição	Efeito no gravitropismo	Referência
Arg1-1	Frameshift	Próximo do final do 7° éxon	Deficiência no gravitropismo	Sedbrook et al., 1998, 1999
Arg1-2	Frameshift	53 pb do início	Respondem apenas parcialmente à graviestimulação	Sedbrook et al., 1998, 1999
Arg1-3	Inserção	Posição não informada pelo autor	Deficiência no gravitropismo	Gleeson et al., 2012
Arl1-4	Inserção	2° intron de ARL1, correspondente à posição entre os aa 87 e 88	RNA de alelo nulo Não afeta o fenótipo gravitrópico	Guan et al., 2003
Arl2-1	Deleção	128 aa de extensão	Deficiência no gravitropismo	Guan et al., 2003
Arl2-2	Inserção	Aminoácido 363 (início)	Deficiência no gravitropismo	Guan et al., 2003
Arl2-3	Inserção	Aminoácido 49 (início)	Deficiência no gravitropismo (agravitrópico)	Guan et al., 2003

Apesar de estar descrito na literatura, o domínio transmembrana de ARG1 foi apenas discretamente identificado pelo software Phobius (relevo em cinza, Figura 11) próximo à posição na qual o domínio transmembrana está relatado na literatura (Figuras 10, 11), tendo o mesmo ocorrido com as outras proteínas homólogas analisadas (dnj-16, ARL1 e ARL2). Em contraste, a análise da proteína transmembrana sid-1, utilizada como controle para essa análise, claramente identificou os domínios transmembrana (Figura 11). O domínio *coiled coil*, essencial para a função da proteína ARG1 em plantas também foi claramente predito (Figura 12) e visualizado em dnj-16, ARL1 e ARL2 a partir da reconstrução da estrutura tridimensional dessas proteínas (Figura 13).



Figura 11. Predição do domínio transmembrana da proteína (A) sid-1 (B) dnj-16 (378 aa), (C) dnj-16 (395 aa), (D) ARG1, (E) ARL1, (F) ARL2 por meio do *software* Phobius. As regiões em cinza representam sequências de aminoácidos que possuem características de domínios transmembrana. Os valores do eixo Y se referem à probabilidade de determinado aminoácido apresentar determinado perfil: transmembrana (cinza); citoplasmático (verde); não-citoplasmático (azul); peptídeo sinal (vermelho).



Figura 12. Predição das estruturas *coiled coil* de: (A) dnj-16 (378 aa), (B) dnj-16 (395 aa), (C) ARG1, (D) ARL1 e (E) ARL2 por meio do software Prabi. As linhas vermelhas, verdes e azuis representam janelas de análise de 14, 21 e 28 aa, respectivamente. Os valores do eixo Y representam a probabilidade de haver estruturas *coiled coil* nas posições da sequência de aminoácidos representadas pelos valores presentes no eixo X.



Figura 13. Reconstituição da estrutura tridimensional das proteínas (A) dnj-16 (378 aa), (B) dnj-16 (395 aa), (C) ARG1, (D) ARL1 e (E) ARL2. A estrutura das proteínas foi obtida com auxílio do software Swiss model.

Apesar das grandes semelhanças entre os domínios de ARG1 e dnj-16, as redes de interações preditas para cada uma dessas proteínas são distintas, havendo apenas algumas semelhanças, como a interação com a proteína HSP70 (Figura 14). Notavelmente, a grande similaridade entre as sequências proteicas de dnj-16, ARG1, ARL1 e ARL2 não foi observada entre as sequências nucleotídicas dessas proteínas (Figuras 15 e 16). A grande similaridade entre as sequências proteicas de dnj-16 e plantas foi reforçada pela realização de um BLASTp utilizando como isca dnj-16.



Figura 14. Rede de interações das proteínas dnj-16 (378 aa) e ARG1 gerada pelo software String. As esferas representam as proteínas, enquanto que as linhas representam a natureza da interação entre as proteínas. Dados de proximidade genômica (linha verde), fusões gênicas (linha vermelha), co-ocorrência nos genomas (linha azul escura), co-expressão (linha preta), dados experimentais e bioquímicos (linha roxa), associação em banco de dados curados (linha azul clara), presença no texto (linha amarela), homologia de proteínas (linha cinza).

dnj-16 ARG1	ATTTAATAGTACCTTTTATTTTTCGGAAACCCTTGTTTCGTTTTTTTCCTCGATCTTC
dnj-16 ARG1	TTCTTCCCCAATCTCTTTTATTTTGTGAGCTTTTTAGATCCTCCTTTCTTCATCGTTTCT
dnj-16 ARG1	TTTCCGAGGTTTCAAATTCGTTCAATTTCTCGATTGAAGATACCTGAAATCGCGTTATTC
dnj-16 ARG1	TAGGTCCGCCGCTGTTGGATCTGCAAATTCCCCTTCGAATTTGAACATTTGTGATTTCAA
dnj-16 ARG1	ATTCTTCGAGAAGATGAGCGCGAAAAAGCTTGAAGGTTCGTCGGCTCCGGCGAATCGACG
dnj-16 ARG1	GGATCCGTACGAGGTCCTTTGTGTATCAAAGGACGCTAATGATCAAGAAATCAAATCCGC
dnj-16 ARG1	ттасадааааттадстстсаадтаадссааааттттссдаттатаасдататсаааастд
dnj-16 ARG1	ATTTTGCTTCAATTTCATCGTCTTCAATCCAATTTCTTAGGGTTTCTGGTTTGTTATATT
dnj-16 ARG1	GAAAAATCTGGAATTGTTCCTATTTGAACTCGTTAGCCATGTCAATTTTTGTTTCCAGTG
dnj-16 ARG1	AGATTGATATGTGAAGAATCTATTGTATACTAATGCCTATACATTATTGTGGATAGGTAT
dnj-16 ARG1	CATCCGGATAAGAATGCGAACAATCCTGATGCTTCTGAGCTTTTCAAGGAAGTTGCATTT
dnj-16 ARG1	ATGGTTTTGCTGTTTGGAAAAAGACGTTCATCACAGGGTAAG TCGTATAGCATTTTGTCTGATCCTGAAAAGAGAAGGCACTATGACAATGCAGGATTTGAG *** *** * *** * *** ** *** ** ***
dnj-16 ARG1	ATTTATAATTGTTTAATTCTCAGCAATTAATTTCCATGAGCAGCG GTGATTGATACTTGTTTCTTATTGGTCTTCATAAGTGTCAATAGGAATAGAGTTGTTTCA *** *** ***** * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	AACGACTAATTGTCAAAATTGAGCGTGTTTTATATTGATTCTGTCTCTGTGCTATTCCAT CACCTTATGTTGCCTCAAATGAGTATGCTTAGTGTCCATTATCA-GCTACTCTATGCATT ** *** * ** **** ** ** * * **** * ****
dnj-16 ARG1	CTTTCCTGCCTAAAATGTATGGCTTTTCTCGTTACATTTCTCCAATA CTT-ACAGCTTCAATAAGAGTTGTTTCATGATATTAGGCACTCGATGCTGATGGAAT *** * ** * ** ** ** ** ** ** * * * * *
dnj-16 ARG1	CTTTCCAAAGAGACGCAGACATAAACGAATGTTTGCCCTATTGCG GGATATGGAAATTGACTTGTCAAACCTCGGGACCGTAAATACCATGTTTGCAGCATTGTT *** **** * * ** ******************
dnj-16 ARG1	AAAGAAGTAAATGAATCACCCTTCCTTTTCCCTTTTTCCACT CAGGTTCAGTTAGTTACCTTTGGTTCACTTAAGAAAGGTATCTGTTTCAGATCCTAACCT

dnj-16 ARG1	ATTTTTTATTTTTTTTTTTTTTTTGAAGCAACATCGGCGACCATGTCAAAAGCAACAACTCTTTTATTATTCTCATAACTTTCAGCAAACTAGGTGTGCCTATCAAGACTACTGTATCTG *** * ** ** ** ** ** ** ** ** * * * *
dnj-16 ARG1	CAGGAGATCAACCTAATGTTCTTGAAGAGGCTATGAATGGAACTGTTACAGTTAGGCCTCTTCCTATTGGAA * * **
dnj-16 ARG1	CAAAGGTTTCGGAAATGGACTTT CATCAGTTAGTGGGAAGGTGTGAACATCACTACATCAGTTAGACTATCTTCTTACCTCAG * ** * ** ***
dnj-16 ARG1	TATCAGCTGCTTGGAGTAGAGAAAATGGTA TTTGTTATGTATTTGGAATTGAAGTTATCTAATTTCTTATTTCAGGTTGAGAAGCAATGC * * * * * * ***** * **
dnj-16 ARG1	ATTAATTTTTTCGGATGACATCTGAAGGCATGCAAGAAAGCAATATTTCGTCTCCAG GCTCATTTTTTTGGAGTTACGATAAGTGAACAAGCAGAATCAGGGGTTGTTGTTAGA * ******* *** * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	GAAATTTCCAGGAAACGTTTAAGATATATTTAGTATTTTAAATGAAATTAATCTCCCTAT GTAACTTCAACAGCACAAAGTAAATTTAAGGTATGCTCGGAATGCAACTAC * ** *** * * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	CATCGAAATTAATAGAAATTAATTCATTTTCCAGGCGTCCGAGGCAGAAATCAAATCAGC TTTTAAATTTAAGAGTACTTAATTAACACTGTG-ACTAAATAACTTTTAAATCTGT * ** **** ** * * ***** * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	GTATCGAAAATTGGCTCTTAAATACCATCCAGATCGTAATCCAAATGATGCTCATGCTCA CCATCTGCAGTTACTTTATTTTGAGCAAGATTCAAGTGGTGGCTATGGATT *** * ** * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	GGAAGAGTTCAAGAAAGTTTCAATCGCATATTCAGTTTTATCTGATCCAA GGCCTTACAGGTACAAAAGAATATTGCTCTTAGTATTTTCTTGTAGTATTACCATGTTAT * * ** *** * * ** * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	ATAAGCGAAGACAGTACGATGTTAGTGGTCCATCAGAAAATCAAT GGAACTGTCTTTAGATGAAGAAGAGGGCACACTATTTTTGATTTTCTTTTACATAATACCT *** ** ** * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	TGGACTTTGAAGGATTTGATGTCTCCGAAATGGGAGGAGTTGGTGAGAAATTTTCAAG GGGAAAACTTTTAGCTAGCTCTCAAAAAGTTTTCCATATTTCTCATGATGATTCC *** * *** * *** *** * *** * *** * ***
dnj-16 ARG1	AATAACATTTAAAAACGTTGATTTCTCCAAGAACAACTGAAAAAGTTAACCCAGAA -ATGACAGTATCAAGCTTCTATTTATTTATGCAGGAAGAGCGTGAGAAAACAGGGAAGGT ** *** * ** * ** * ** ** ** ** ** ** * *
dnj-16 ARG1	AATTCCA-GGGACTTTTTTTTTCTAATTATATATAAATAATTGCAGGTCGTGTCTTTGGAGC GACATCAGCTGGCATGTATTTCTTACATTTTCAAGTGTATAGAATGGATACAACTGTCAA * ** * * * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	ACTCTTCAGCAAGCTTGGAGTACCTATTCCCACACAAATTGTCCCAAAAGTTCTTGC TGCGGTATGCAAGTTTTGAGCTCTTTTCCTTTCATAATTAGCTGGCATATTAGAATATGC * ***** ** ** * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	ACAGGCACGTCACATTTGTATGGGACAAGAATGTGATGTTCAGGCACGA AGAGGTACTAAAGCAATCCACATTGTGGTTATTGTGCAGTTGGCTGCAGCCAAGGACCCT * ** ** *** **** * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	CAACTCCCTCCCGGGGGAGACTGTAACTTCTTCTGTGAGCAA GAATCTGCTTTCTTCAAGCGATTGGAAGGTCTTCAACCTTGTGAGGTTTCGGAACTGAAA ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * *
dnj-16 ARG1	GCAGGTGAGAAATTTGTTGTTGTACCATGAAAATGTGAAAAATTTAATATTCGAAAAATTC GCTGGCACGCATATATTTGCAGTTTATGGTATGACTTATTACTTTACTTAC

	** ** * * * *** * * * *** *** * ***
dnj-16 ARG1	GGATGGATTTTAAGTTTTAATTTTTTTTTTTTTTTTTT
dnj-16 ARG1	TAAAACTAATATTAAAATTAATTTCAGCACGCCCACTTCTACGAAATTAACATACAG AAGACTGCATCTTACACGATTGAAGCACTCTGTGCCAAGACCTATGAGGATACAACAGAG * * ** *** * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	GAAGAACATCGAAAGAATGGAGTTGCTATCATTTGT- AAGTTAAAGGAGATTGAAGCTCAAATCTTAAGAAAGAGAAACGAACTGCGGCAGTTTGAA * ** * ** ** ** ** ** *** ***
dnj-16 ARG1	AAAAGTTCATCTAGTAAATTCAAGTT ACAGAGTACCGAAAAGTAATTTTATACTATTTGAGAGAGA
dnj-16 ARG1	AGTGTTATTCGATAAAGAAGGAGGTGTCCGA-ATGATCCAAGAAA CATGTAACTTGATATAAATTTGCTATATTCGTTTGCAGGCTTTGGCGCGGGTTTCAAGAAG *** * * ** * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	GTGGGAAACGAGGAAAAGCCGGAACTCAAGCCGACATGTTCTTTGTACCGTACAATGT TTACCAACAGATATACACAGGAGAAACAAACTGTGCGTTCTTTTCTCTATATTACACTGT * ** ** * * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	GGCCAATATTCAAGAATTCAATGCAATGAAATATCATTTGGAGGATAA ATCCTTTACTTTGATTAACACGCAATGGTTCTATAGAAGAGATGTTGTGCACATGAACCA ** ** ** ** ** ** ** * * * * * * *
dnj-16 ARG1	GGAAACTCCATTGGCTTTTCATTATTTGGATAGTTTTGAGA-TGCAAACTGCGACACTTT CAGAGGAGCTCTTGCATTTGTTTTCTGACATACTTTTGATCATTCTAATCGTGTTTGGTT * * * ** ** ** * * * * ** ** ** * * *
dnj-16 ARG1	TGGAGACACGGAAGCATTATATTGCAGTTTATGGTGATAATTGGATAAGCGATGTCAAAT TGTGTATATTGAATAATGGTGCAGGTGGATGAACTGCTAAAGCAACGGGATAC ** * * *** ** ** ** ** * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	ATT-CAATA-ACCTTCCTGTGTGGAACCTTCTGCTGTCGAGCAACTGAATGAGATTCA AATCCATTCGACCTTCTCTGTTGTGAAGACACCAAGCGGCA-ACAACTTGAGCAATGGAA * * ** * * ****** * **** * * * * * *
dnj-16 ARG1	GGATACGGAGAAATCGATTTCTATTATTAAAAAAGAAATGCTGGATTTCCAAAGAGAATT GTAGC-AGCAAAGCTCAGGGAGATGAATCAAAAGGTGATGGGGATAGTGCGGGAGAA * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	CACAGAAGCTAAGAGAAAATATGATGAAGCTGT-GGCGAAGTTGAAGGTAAGA GAAGGCGGAACAGAGAATAGAGACAAATCCAAGAGGAAATGGTTCAACTTGAACCTAAAA * * * * * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	TTACTTACTTCCGGAAGCTGAAAGAATATTTGTTTTAATCAAAAATTTAATTTT GGATCTGATAAGAAGCTTGGTTGATCAGAACACGGATTTGTTGCGGGGTCATTGGTATTTT * * * * * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	CAGGTACAAGACGACACAATTCTGAAAGCGCTGGCACATCGTGAAGAGCTCTACAATGAA GTTCATTCGTTAGACAGAACTGACTCGGTGAAGGTTTGTCATCGGGTGCTCTATGTAGGC **** ** * * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	GTTCTCCAGAAGTCTCAAGAACCGTATAACAAGAAAGTTTCCCCATCTAAATCA ATATATAATCATGGGAATGGTTCGAGAGAGATGAAGAGAGAG
dnj-16 ARG1	TCGGGTGGTCTCCTTGGATGGTTCAAATGA   ATGGATGGAAGGATTTGTATTCATAGGAGTGTTTTGATATGTATG
dnj-16	
ARG1	TTCATTGTTTGTTAAACAGAATTGTCATTGTGATGGTGGATTGATGATATATTCAGATTC
----------------	--
dnj-16 ARG1	AAAATTATAATACCAGACTTGCTTCAATCCAGATTTATTT
dnj-16 ARG1	GTTAAAACTTAATAAATGAAC

Figura 15. Alinhamento das sequências gênicas (éxons e íntrons) dos genes *dnj-16* e *ARG1* utilizando o software Clustal Omega. (\*) representa os nucleotídeos que são idênticos nas sequências analisadas.

dnj-16 ARG1	ATGGTTTTGCTGTTTGGAAAAAGACGTTCATCACAGGCAACATCGGCGACCATGTCAAAA
dnj-16 ARG1	GCAACAACTCCAGGAGATCAACCAAAGGTTTCGGAAATGGACTTTTATCAGCTGCTTGGA CAAGTGTATAGA ** ** * **
dnj-16 ARG1	GTAGAGAAAATGGCGTCCGAGGCAGAAATCAAATCAGCGTATCGAAAATTGGCTCTTAAA ATGGATACAA
dnj-16 ARG1	TACCATCCAGATCGTAATCCAAATGATGCTCATGCTCAGGAAGAGTTCAAGAAAGTTTCA CTGTCAATGCGTTGGCTGCAGCCAAGGA * * **** ** * * **** *
dnj-16 ARG1	ATCGCATATTCAGTTTTATCTGATCCAAATAAGCGAAGACAGTACGATGTTAGTGGTCCA CCCTGAATCTGCTTTCTTCAAGCGA * * * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	TCAGAAAATCAATTGGACTTTGAAGGATTTGATGTCTCCGAAATGGGAGGAGTTGGTCGT TTGGAAGGTCTTCAACCTTGTGAGGTTTCGGAACTGAAAGCTGGCACGCAT * ** * * ** ** * *** ** ** ** ** ** **
dnj-16 ARG1	GTCTTTGGAGCACTCTTCAGCAAGCTTGGAGTACCT ATATTTGCAGTTTATGGTGATAATTTCTTTAAGACTGCATCTTACACGATTGAAGCACTC * ****
dnj-16 ARG1	ATTCCCACACAAATTGTCCCAAAAGTTCTTGCACAGGCACGTCACATTTGTATGGGACAA TGTGCCAAGACCTATGAGGATACAACAGAGAAGTTAAAGGAGATTGAAGC * *** * * * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	GAATGTGATGTTCAGGCACGACAACTCCCTCCCGGGGGAGACTGTAACTTCTTCTGTGAGC TCAAATCTTAAGAAAGAGAAACGAACTGCGGCAGTTTGAAACAGAGTACCGAA * ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** **
dnj-16 ARG1	AAGCAGCACGCCCACTTCTACGAAATTAACATACAGGAAGAACATCGAAAGAATGGAAAG-CTTTGGCGCGGGTTTCAAGAAGTTACCAACAGATATACACAGGAGAAACAAAC
dnj-16 ARG1	GTTGCTATCATTTGTAAAAGTTCATCTAGTAAATTCAAGTTAGTGTTATT-CGATAAAGA GATGAACTGCTAAAGCA-ACGGGATACAATCCATTCGACCTTCTCTGTTGTGAAGACACC * ** * * * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	AGGAGGTGTCCGAATGATCCAAGAAAGTGGGAAACGAGGAAAA-GCCGGAACTCAAGCCG AAGCGGCAACAACTTGAGCAATGGAAGTAGCAGCAAAGCTCAGGGAGATGAATCAAAAGG * * ** * * * * * * * * * * * * * * *
dnj-16 ARG1	ACATGTTCTTTGTACCGTACAATGTGGCCAATATTCAAGAATTCAATGCAATG

	*** * ** * * *** *** * * *** *** *
dnj-16 ARG1	ATCATTTGGAGGATAAGGAAACTCCATTGGCTTTTCATTATTTGGATAGTTTTGAGATGC A *
dnj-16 ARG1	AAACTGCGACACTTTTGGAGACACGGAAGCATTATATTGCAGTTTATGGTGATAATTGGA
dnj-16 ARG1	TAAGCGATGTCAAATATTCAATAACCTTCCTTCCTGTGGAACCTTCTGCTGTCGAGCAAC
dnj-16 ARG1	TGAATGAGATTCAGGATACGGAGAAATCGATTTCTATTATTAAAAAAGAAATGCTGGATT
dnj-16 ARG1	TCCAAAGAGAATTCACAGAAGCTAAGAGAAAATATGATGAAGCTGTGGCGAAGTTGAAGG
dnj-16 ARG1	TACAAGACGACACAATTCTGAAAGCGCTGGCACATCGTGAAGAGCTCTACAATGAAGTTC TGGTTCAACTTGAACC *** ** ** ** ***
dnj-16 ARG1	TCCAGAAGTCTCAAGAACCGTATAACAAGAAAGTTTCCCCATCTAAATCATCGGGTGGTC TAAAAGGATCTGATAAGAAG
dnj-16 ARG1	TCCTTGGATGGTTCAAATGA CTTGGTTGA ***** **

Figura 16. Alinhamento dos CDS dos genes *dnj-16* e *ARG1* por meio do software Clustal Omega. (\*) representa os nucleotídeos que são idênticos nas sequências analisadas.

Os hits gerados por essa busca foram utilizados na elaboração de uma filogenia, que apontou para uma grande semelhança entre essa proteína de *C. elegans* com proteínas encontradas, principalmentem em outros nematoides, plantas e oomicetos (Figura 17). Devido à baixa similaridade das sequências nucleotídicas, o BLASTn utilizando o CDS de *dnj-16* como isca, gerou apenas sequências nucleotídicas de outros nematoides como os melhores hits, não sendo observada grande similaridade com sequências de plantas e oomicetos. Com estes dados foi construída uma filogenia baseada em DNA (Figura 18). Além disso, foi realizado um tBLASTn utilizando como isca a sequência proteica de dnj-16 (Tabela 5). No entanto, devido à natureza diversa das sequências nucleotídicas geradas nessa busca, não foi realizada uma filogenia a partir desses dados.



Figura 17. Filogenia baseada em dnj-16 (sequência proteica). A história evolutiva da proteína dnj-16 foi inferida a partir de sequências de proteínas homólogas à dnj-16 de C. elegans por meio do método de "Maximum Likelihood", baseado no modelo Tamura-Nei (TAMURA & NEI, 1993). As espécies de nematoides e plantas estão indicadas em vermelho. A árvore acima representada é a mais parcimoniosa e foi obtida por meio dos algoritmos Neighbor-Join and BioNJ. Todas as posições contendo lacunas e com ausência de dados foram eliminadas. As análises filogenéticas foram realizadas no MEGA 7 (KUMAR, et al., 2016).



**Figura 18. Filogenia baseada em dnj-16 (sequência nucleotídica - CDS).** A história evolutiva foi inferida usando o método "Maximum Likelihood" baseado no modelo Tamura-Nei (TAMURA & NEI, 1993). A árvore acima representada é a mais parcimoniosa e foi obtida por meio dos algoritmos Neighbor-Join and BioNJ. Todas as posições contendo lacunas e com ausência de dados foram eliminadas. As análises filogenéticas foram realizadas no MEGA 7 (KUMAR, et al., 2016).

		Natureza da	Pontuação	Pontuação		_	
Espécie	Número de acesso	sequência	máxima	total	Cobertura	e-value	Identidade
Aegilops tauschii subsp.							
tauschii	XM_020312410.1	mRNA	192	192	88%	8,00E-52	36%
Albugo laibachii	FR833668.1	Genômica	265	265	89%	2,00E-75	44%
Ananas comosus	XM_020235005.1	mRNA	192	192	96%	4,00E-51	35%
Aphanomyces astaci	XM_009839862.1	mRNA	239	239	94%	3,00E-71	39%
Aphanomyces invadans	XM_008882500.1	mRNA	241	241	91%	2,00E-72	40%
Asparagus officinalis	XM_020409404.1	mRNA	189	189	92%	4,00E-51	35%
Brassica napus	XM_022691010.1	mRNA	192	192	90%	3,00E-52	36%
Brassica oleracea var.							
oleracea	XM_013782390.1	mRNA	189	189	88%	3,00E-51	36%
Brassica rapa	XM_009117226.2	mRNA	192	192	88%	3,00E-52 7,00E-	36%
Brugia malayi	XM_001900873.1	mRNA	375	375	86%	126	56%
Caenorhabditis briggsae	XM_002642495.1	mRNA	683	683	100%	0.0	87%
Caenorhabditis elegans	NM_001267961.1	mRNA	773	773	100%	0.0	98%
Caenorhabditis remanei	XM_003095896.1	mRNA	689	689	100%	0.0	88%
Caenorhabditis sp.	AP018153.1	Genômica	303	303	46%	6,00E-89	80%
Cajanus cajan	XM_020361946.1	mRNA	191	191	88%	2,00E-51	37%
Caligus rogercresseyi	BT076180.1	mRNA	222	222	92%	1,00E-64	35%
Capsicum annuum	XM_016692443.1	mRNA	197	197	96%	2,00E-53	36%
Cicer arietinum	XM_004504451.2	mRNA	191	191	92%	1,00E-51	36%
Daucus carota	XM_017360074.1	mRNA	192	192	96%	6,00E-52	35%
Eucalyptus grandis	XM_010046361.2	mRNA	190	190	88%	5,00E-51	37%
Eutrema salsugineum	XM_006415964.1	mRNA	190	190	90%	1,00E-51	36%
Glycine max	XM_006574519.2	mRNA	189	189	87%	1,00E-51	37%
Hevea brasiliensis	XM_021780158.1	mRNA	193	193	85%	5,00E-52	39%

Tabela 5. Resultado da busca (tBLASTn) por sequências nucleotídicas que codificam proteínas homólogas a dnj-16 de C. elegans.

Hordeum vulgare subsp.							
vulgare	AK359406.1	mRNA	187	187	91%	1,00E-50	35%
Ipomoea nil	XM_019309536.1	mRNA	191	191	88%	1,00E-51	37%
Jatropha curcas	XM_012236640.2	mRNA	194	194	90%	1,00E-52	37%
Juglans regia	XM_018968859.1	mRNA	195	195	96%	6,00E-53	35%
Lepeophtheirus salmonis	BT078289.1	mRNA	223	223	93%	2,00E-65	35%
						7,00E-	
Loa loa	XM_020445558.1	mRNA	385	385	95%	129	53%
Lotus japonicus	AK337869.1	cDNA	192	192	93%	4,00E-52	36%
Lupinus angustifolius	XM_019589951.1	mRNA	194	194	88%	6,00E-53	37%
Malus x domestica	XM_017337047.1	mRNA	193	193	88%	4,00E-52	37%
Manihot esculenta	XM_021757774.1	mRNA	192	192	90%	7,00E-52	36%
Medicago truncatula	XM_003613320.2	mRNA	195	195	91%	1,00E-52	36%
Musa acuminata subsp.							
malaccensis	XM_009392960.2	mRNA	190	190	92%	5,00E-51	35%
						5,00E-	
Necator americanus	XM_013444849.1	mRNA	486	486	98%	169	62%
Nelumbo nucifera	XM_010266773.2	mRNA	189	189	94%	5,00E-51	34%
Nicotiana sylvestris	XM_009791384.1	mRNA	192	192	89%	3,00E-52	37%
Nicotiana tabacum	XM_016608299.1	mRNA	192	192	89%	3,00E-52	37%
Nicotiana tomentosiformis	XM_009629014.2	mRNA	189	189	89%	4,00E-51	36%
						5,00E-	
Parastrongyloides trichosuri	LM523158.1	Genômica	350	350	98%	105	46%
Phaseolus vulgaris	XM_007157449.1	mRNA	194	194	92%	2,00E-52	37%
Phytophthora infestans	XM_002997397.1	mRNA	256	256	96%	9,00E-78	41%
Phytophthora parasitica	XM_008915915.1	mRNA	257	257	94%	1,00E-78	42%
Phytophthora sojae	XM_009519106.1	mRNA	259	259	91%	2,00E-79	43%
Prunus avium	XM_021963183.1	mRNA	193	193	88%	4,00E-52	38%
Prunus mume	XM_008246736.2	mRNA	194	194	88%	1,00E-52	38%

XM_007222644.2	mRNA	196	196	88%	3,00E-53	38%
XR_667722.2	mRNA	191	191	88%	1,00E-51	37%
XM_018631395.1	mRNA	191	191	90%	8,00E-52	36%
LK995556.1	Genômica	331	331	94%	2,00E-98	48%
XM_019721627.1	mRNA	190	190	90%	1,00E-52	35%
XM_012339297.1	mRNA	223	223	93%	1,00E-65	39%
XM_011088183.2	mRNA	192	192	88%	3,00E-51	37%
XM_004238670.3	mRNA	196	196	90%	3,00E-53	37%
XM_015221308.1	mRNA	195	195	90%	9,00E-53	36%
XM_006355868.2	mRNA	193	193	90%	3,00E-52	36%
XM_002454262.2	mRNA	192	192	90%	2,00E-51	35%
XM_021986719.1	mRNA	191	191	92%	3,00E-51	35%
LM525555.1	Genômica	293	367	94%	2,00E-91	46%
LN609529.1	Genômica	283	283	83%	5,00E-82	44%
LL999108.1	Genômica	283	283	83%	5,00E-82	44%
					5,00E-	
LM524968.1	Genômica	364	364	96%	110	49%
XM_003371346.1	mRNA	268	268	94%	1,00E-82	41%
XM_017572309.1	mRNA	194	194	88%	1,00E-52	38%
XM 014636760.2	mRNA	194	194	88%	9,00E-53	38%
XM_010654676.2	mRNA	191	191	90%	4,00E-51	37%
	XM_007222644.2 XR_667722.2 XM_018631395.1 LK995556.1 XM_019721627.1 XM_012339297.1 XM_011088183.2 XM_004238670.3 XM_004238670.3 XM_015221308.1 XM_006355868.2 XM_002454262.2 XM_002454262.2 XM_021986719.1 LM525555.1 LN609529.1 LL999108.1 LM524968.1 XM_003371346.1 XM_017572309.1 XM_014636760.2 XM_010654676.2	XM_007222644.2         mRNA           XR_667722.2         mRNA           XM_018631395.1         mRNA           LK995556.1         Genômica           XM_019721627.1         mRNA           XM_012339297.1         mRNA           XM_004238670.3         mRNA           XM_004238670.3         mRNA           XM_004238670.3         mRNA           XM_015221308.1         mRNA           XM_002454262.2         mRNA           XM_021986719.1         mRNA           LM525555.1         Genômica           LN609529.1         Genômica           LN609529.1         Genômica           LM524968.1         Genômica           XM_017572309.1         mRNA           XM_014636760.2         mRNA           XM_010654676.2         mRNA	XM_007222644.2mRNA196XR_667722.2mRNA191XM_018631395.1mRNA191LK995556.1Genômica331XM_019721627.1mRNA190XM_012339297.1mRNA190XM_012339297.1mRNA192XM_01088183.2mRNA192XM_004238670.3mRNA196XM_015221308.1mRNA195XM_006355868.2mRNA193XM_002454262.2mRNA193XM_021986719.1mRNA191LM52555.1Genômica293LN609529.1Genômica283LM524968.1Genômica364XM_01371346.1mRNA194XM_014636760.2mRNA194XM_010654676.2mRNA191	XM_007222644.2mRNA196196XR_667722.2mRNA191191XM_018631395.1mRNA191191LK995556.1Genômica331331XM_019721627.1mRNA190190XM_012339297.1mRNA223223XM_011088183.2mRNA192192XM_004238670.3mRNA196196XM_004238670.3mRNA195195XM_005355868.2mRNA193193XM_02454262.2mRNA192192XM_021986719.1mRNA191191LM52555.1Genômica283283LL999108.1Genômica283283LM524968.1Genômica364364XM_014636760.2mRNA194194XM_014636760.2mRNA191191	XM_007222644.2       mRNA       196       196       88%         XR_667722.2       mRNA       191       191       88%         XM_018631395.1       mRNA       191       191       90%         LK995556.1       Genômica       331       331       94%         XM_019721627.1       mRNA       190       190       90%         XM_012339297.1       mRNA       223       223       93%         XM_011088183.2       mRNA       192       192       88%         XM_004238670.3       mRNA       196       196       90%         XM_015221308.1       mRNA       195       195       90%         XM_006355868.2       mRNA       193       193       90%         XM_002454262.2       mRNA       192       192       90%         XM_021986719.1       mRNA       191       191       92%         LM525555.1       Genômica       283       283       83%         LL999108.1       Genômica       364       364       96%         XM_003371346.1       mRNA       194       194       88%         XM_014636760.2       mRNA       194       194       88%         XM	XM_007222644.2         mRNA         196         196         88%         3,00E-53           XR_667722.2         mRNA         191         191         88%         1,00E-51           XM_018631395.1         mRNA         191         191         90%         8,00E-52           LK995556.1         Genômica         331         331         94%         2,00E-98           XM_019721627.1         mRNA         190         190         90%         1,00E-52           XM_012339297.1         mRNA         223         223         93%         1,00E-65           XM_011088183.2         mRNA         192         192         88%         3,00E-51           XM_004238670.3         mRNA         196         196         90%         3,00E-53           XM_015221308.1         mRNA         195         195         90%         9,00E-53           XM_02454262.2         mRNA         192         192         90%         2,00E-51           XM_021986719.1         mRNA         191         191         92%         3,00E-51           LM525555.1         Genômica         283         283         83%         5,00E-82           LL999108.1         Genômica         283         283

Para se avaliar conservação de sintenia, foi realizado um tBLASTx das sequências nucleotídicas da região, envolvendo 2 genes *upstream* a *dnj-16* e 1 gene *downstream* contra a região homóloga à *dnj-16* no cromossomo de *Phytophthora infestans* (um oomiceto; genes PITG\_19126, PITG\_19127) e 1 gene *downstream* (PITG\_19129) (região genômica (282.400-288.500). Essa análise demonstrou que a similaridade entre as sequências se limita ao gene *dnj-16* (Figura 19).

Uma vez que a TGH poderia ter se dado por meio de DNA ou RNA, dessa forma, foi realizada uma análise comparativa entre a estrutura do gene *dnj-16* e do seu homólogo em *P. parasitica*. Interessantemente, os genes *ARG1* e *dnj-16* possui íntrons, enquanto que a sequencia genômica homóloga em *P. parasitica* (NW\_008649063.1) não possui íntrons. Adicionalmente os genes próximos a essa sequência contêm, sim, íntrons, o que evidencia que essa espécie de oomiceto parasita tem sim íntrons e que a anotação foi feita adequadamente (Figura 20, compare com *P. infestans*, Figura 21). Assim, tanto as sequências nucleotídicas de *dnj-16* como de *ARG1* (Figura 22) possuem íntrons e apenas em *Phytophthora* eles não são observados.

	Color key for alignr	nent scores			
	<b>4</b> 0 <b>4</b> 0-50 <b>5</b> 0-80	80-200	200		
		4192999 4193999 4	194999		
	4105000 4105555 4150555 41515	77 4172777 4173777 4	104000		
	4193939				
t Matrix View					
scriptions					
Sequences producing	significant alignments:				
Select: All None Sel	octed:0				
1 Alignments Dov	nload v GenBank Graphics				
		Max	Total Query	E	
	Description	score	score cover	value	Accession
	na T20 4 autocraanti 75 conomia cooffeld whole conome chotau	sequence 120	826 18%	1e-47 5	NW_003303684.
Phytophthora infest	ris 130-4 supercont 1.75 genomic scanold, whole genome sholgun		020 10/0		

Figura 19. Resultado do tBLASTx de 2 genes *upstream* a *dnj-16* e 1 gene *downstream* (*xbp-1*; todos de *C. elegans*) contra a região que envolve 2 genes *upstream* à região homóloga à *dnj-16* no cromossomo de *Phytophthora infestans* e 1 gene *downstream*. Apenas 1 hit (NW\_03303684.1) foi gerado por essa busca.

•



Figura 20. Sequências genômicas (verde), de mRNA (azul) e proteicas (vermelho) de *Phytothphtora parasitica* referentes a *dnj-16* (NW\_008649063.1) (A) e dos genes que o flanqueiam (B). A sequência homóloga a *dnj-16* não possui íntrons enquanto que os genes que a flanqueiam os possuem.



## Bibliography

\$ ?



Figura 21. Sequências genômicas (verde), de mRNA (azul) e proteica (proteica) presentes no gene (NW\_003303684.1) de P. infestans homólogo a dnj-16.

83

Genomic context

Location: chromosome: 1

See ARG1 in Genome Data Viewer Map Viewer

Exon count: 11

Sequence: Chromosome: 1; NC\_003070.9 (25631689..25634780, complement)



Figura 22. Análise da sequência genômica do gene ARG1 (NC\_003070.9 (25631689..25634780) de A. thaliana a partir dos dados de RefSeq do TAIR.

Ao se analisar detalhadamente os íntrons de *dnj-16* no wormbase, notou-se que o primeiro deles provavelmente é o promotor desse gene pois existem vários sítios de ligação de fatores de transcrição nessa região (Figura 23) e a isoforma contendo apenas a sequência *downstream* a esse íntron é muito mais expressa do que a sequência gênica completa (Figura 24). O BLASTn dessa sequência intrônica contra oomicetos encontrou uma sequência homóloga em *Phytophthora infestans*, porém o *e-value* dessa sequência foi alto (Apêndice X, Figura 1). Além disso, outra busca (BLASTn) utilizando também como isca essa sequência intrônica contra viridiplantae encontrou alguns *hits* em plantas, sendo que o melhor *hit* foi observado na espécie *A. lyrata* (Apêndice X, Figura 2, 3).



**Figura 23. Estrutura dos éxons/íntrons do gene** *dnj-16* **e localização de regiões de ligação de fatores de transcrição (linhas em verde) representando a possível localização da região promotora de** *dnj-16***. Os éxons e íntrons dos transcritos de** *dnj-16* **estão representados por caixas em rosa e linhas triangulares ligando essas caixas, respectivamente. Fonte: wormbase.** 



Figura 24. Estrutura (introns e éxons) das isoformas do gene *dnj-16* e suas respectivas taxas de expressão obtidas a partir de dados de RNA Seq (blocos em preto). Os éxons e íntrons dos transcritos de *dnj-16* estão representados por caixas em rosa e linhas triangulares, respectivamente. Fonte: wormbase.

Por outro lado, o BLASTp dos 12 aa derivados do primeiro éxon do gene *dnj-16 (i.e., upstream* ao promotor) contra sequências de proteínas não reduntantes (NR) mostrou que apenas *C. elegans* possui essa sequência (Figura 25). Interessantemente, foi observada abundância de sinais vegetais de terminação (FUE, NUE, CE) na região 3'UTR de *dnj-16* e menor ocorrência desses elementos no primeiro íntron de *dnj-16* (Figura 26, Apêndice XI, Figura 1).

O teste Z realizado rejeitou a hipótese de neutralidade ( $d_N=d_S$ ), apontando para diferenças entre o número de substituições sinônimas e não sinônimas por sítio (Figura 27). Já o teste Tajima de Neutralidade apontou para evidências de que haveria uma seleção balanceadora atuando nessas sequências (Tabela 6).

A	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
	DNaJ domain (prokaryotic heat shock protein) [Caenorhabditis elegans]	40.9	40.9	100%	0.004	100%	NP 001254890.1
	DNaJ domain (prokaryotic heat shock protein) [Caenorhabditis elegans]	40.9	40.9	100%	0.004	100%	NP 001254891.1
	hypothetical protein FL82 17497 [Caenorhabditis remanei]	37.5	37.5	100%	0.060	92%	OZF80356.1
	CRE-DNJ-16 protein [Caenorhabditis remanei]	37.5	37.5	100%	0.060	92%	XP 003095944.1
	hypothetical protein FL83_07286 [Caenorhabditis latens]	37.5	37.5	100%	0.060	92%	OZG18401.1
	CBN-DNJ-16 protein [Caenorhabditis brenneri]	32.0	32.0	100%	5.5	83%	EGT45655.1
	PREDICTED: anion exchange protein 3 [Takifugu rubripes]	30.3	30.3	100%	22	75%	XP 011610800.1
	Por secretion system protein [Prevotella jejuni]	29.9	29.9	91%	31	82%	WP 089365699.1
	hypothetical protein [Prevotella sp. oral taxon 306]	29.9	29.9	91%	31	82%	WP 009434379.1
	anion exchanger protein [Lethenteron camtschaticum]	29.9	29.9	91%	31	82%	BAH03332.1
	major anion transport protein band 3 [Lethenteron camtschaticum]	29.9	29.9	91%	32	82%	AAD14330.1
	EamA/RhaT family transporter [Kiloniella majae]	29.5	29.5	91%	44	77%	WP 085906663.1
	EamA/RhaT family transporter [Kiloniella majae]	29.5	29.5	91%	44	77%	WP 085901855.1
B	DNaJ domain (prokaryotic heat shock protein) [Caenorhabditis elegans] Sequence ID: <u>NP_001254890_1</u> Length: 395_Number of Matches: 1			▼ Next	A Prev	vious 🥻	Descriptions
	▶ See 1 more title(s)		Rela	ted Info	ormatio	n	
	Range 1: 18 to 29 GenPept Graphics Vext Match A Previous Match		Gene	- associat	ted gene	details	
	Score         Expect         Identities         Positives         Gaps           40.9 bits(89)         0.004         12/12(100%)         12/12(100%)         0/12(0%)           Query 1         MSKATTPGODPK         12         MSKATTPGODPK         29           Sbjct         18         MSKATTPGODPK         29         18		Ident NP_0	ical Prote 01254890	ins - Ider 0.1	ntical pro	iteins to
1	Download ~ GenPept Graphics			▼ Next	A Prev	vious 🖌	Descriptions
	DNaJ domain (prokaryotic heat shock protein) [Caenorhabditis elegans] sequence ID: <u>NP_0012548911</u> Length: 378 Number of Matches: 1 > See 1 more title(s)						
	Ranna 1: 1 to 12 GasDart Graphics		Rela	ted Info	ormatio	n	
	Score         Expect         Identities         Positives         Gaps           40.9 bits(89)         0.004         12/12(100%)         0/12(0%)         0/12(0%)           Query 1         MSKATTPG00PK         12         12         12		Gene Ident NP_0	- associat ical Prote 0125489	ted gene ins - Ider 1.1	details ntical pro	oteins to
	ISKATTPODER						

**Figura 25. A**. Resultado da busca (BLASTp) utilizando a sequência do primeiro éxon de dnj-16 como isca contra sequências proteicas não redundantes (nr) sem especificar o alvo. **B**. Melhor *hit* da busca encontrou apenas *C. elegans* com completa correspondência com a isca.

# TCCCTATCAAG<u>ATTTTTTT</u>AAAACTATTTCACAAGAAGAATGGG<u>TCTTTTAAATTTTTAAATTT</u>CACTTTCCAGAGTT AGTTTCGATATTTATTGATTGTTGATAACATTTAATTTCTCCTCTATTTTCTAATGTCGATCCATCAGATC<u>TCTTTTTT</u> <u>CTTTTTT</u>A<mark>TGGTGT</mark>AATTTAGCAAAACTTTAAGTGTTCTGTACTCAATTTCTAGATAAATTACTAG<mark>TTTTGC</mark>TCTTGAT TGAAAAATATA<mark>AATAAA</mark>ATATTTATGGC <mark>\* NNNNNNNN 2º CE</mark>

TTAATT: FUE (- 156)

**AATAAA**: NUE (- 17)

\*: sítio de clivagem

NN: sequência hipotética de 10 nucleotídeos após o sítio de clivagem a antes do segundo CE

TTTTGC: primeiro *cleavage element* (CE; *upstream* ao sítio de clivagem)

2º CE: segundo cleavage element (CE; downstream ao sítio de clivagem)

Azul: região rica em "GU"

Sublinhado: outros FUE e NUE identificados.

Figura 26. Caracterização da região 3'UTR do gene *dnj-16 de C. elegans*. Os potenciais sítios de terminação vegetal (FUE, NUE, CE e CS) estão mostrados em diferentes cores, além do possível sítio rico em "GU" típico de animais.

1. C.remanei		-24.888	-20.364	-12.477	-9.385	-11.820
2. C.briggsae	0.000		-25.139	-13.281	-12.027	-11.042
3. C.elegans	0.000	0.000		-7.835	-7.545	-7.732
4. C.anuum	0.000	0.000	0.000		-7.502	-17.044
5. S.lycopersicum	0.000	0.000	0.000	0.000		-16.623
6. A.thaliana	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

Figura 27. Teste de evolução neutra envolvendo as sequências homólogas a *dnj-16* das espécies *C. remanei, C. briggsae, C. elegams, Capsicum annum, S. lycopersicum e A. thaliana*. A probabilidade de rejeitar a hipótese nula de estrita neutralidade ( $d_N = d_S$ ) (abaixo da diagonal) é mostrada. Os valores p<0,05 são considerados significantes e estão demarcados em amarelo. Os valores expressos na parte superior da figura se referem à diferença entre as substituições sinônimas e não sinônimas por sítio respectivamente. As análises foram conduzidas utilizando o método Nei-Gojobori. Todas as posições contendo lacunas e com ausência dados foram eliminadas. Um total de 369 posições foram geradas no conjunto de dados finais. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (NEI & GOJOBORI, 1986; KUMAR, STECHER & TAMURA, 2016).

Tabela 6. Resultado do teste Tajima de Neutralidade de sequências homólogas das espécies *C. remanei, C. briggsae, C. elegams, Capsicum annum, S. lycopersicum e A. thaliana*. A análise envolveu 6 sequências de nucleotídeos. As posições dos códons incluídas foram a 1°, a 2° e 3° não codificantes. Todas as posições contendo lacunas e com ausência de dados foram eliminadas. Há um total de 1110 posições no banco de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Abreviações: m: número de sequências, n: número total de sítios; S= Número de sítios de segregação, Ps = Sin,  $\Theta = ps/ai$ ,  $\pi$ = diversidade nucleotídica, e o teste estatístico Tajima.

т	S	$P_s$	θ	π	D
6	791	0.712613	0.312093	0.433273	2.529030

Interessantemente, os valores de divergência média de identidade e similaridade de sequências homólogas ao gene *dnj-16* encontradas em espécies do gênero *Caenorhabditis* foram próximo aos observados entre o gene *ARG1* e os seus homólogos em plantas (Tabela 7). Continuando a análise comparativa entre *C. elegans* e *Phytophtora*, foi realizado um tBLASTn utilizando como isca a fusão quimérica das sequências do domínio DnaJ do gene dnj-16 (de *C. elegans*) com o domínio COA (plantas), contra as espécies do gênero *Phytophtora*. Essa busca foi capaz de identificar COA em *Phytophtora infestans* e *P. parasitica* (Figura 28). O BLASTp da sequência formada pela fusão do domínio DnaJ de *C. elegans* com o domínio COA de plantas contra 10 espécies de plantas indicou que há um sinal molecular de COA em plantas (Figura 29). Por fim, o BLASTp utilizando a isoforma proteica de dnj-16 com 378 aa contra viridiplantae incluiu na zona de homologia a região correspondente ao domínio COA de dnj-16, demonstrando que o algoritmo consegue detectar regiões homólogas à esse domínio em plantas (Figura 30)

Tabela 7. Divergência média de identidade (DMI) e a divergência média de similaridade (DMS) entre pares de genes homólogos (*C. elegans* x *A. thaliana*) e pares *dnj-16/ARG1* (*Caenorhabiditis sp.* x *A. thaliana*). Foram analisadas 30 pares de genes homólogos e 6 pares *dnj-16/ARG1*.

Pares hom	de genes ólogos	Pa dnj-16	res /ARG1
DMI	DMS	DMI	DMS
0,696	0,555	0,680	0,510



Figura 28. Resultado da busca (tBLASTn) utilizando a sequência quimérica dos domínios DnaJ de *C. elegans* e COA de plantas como isca contra as espécies do gênero *Phytophtora*. As linhas em rosa e preto representam o grau de similaridade com a isca dos resultados produzidos pela busca.



Figura 29. Resultado da busca (BLASTp) da sequência fusionada do domínio de DnaJ de *C. elegans* com o domínio COA de plantas contra sequências proteicas de homólogos de *dnj-16* em 10 espécies de plantas (*Capsicum anuum, Prunus persica, Solanum lycopersicum, Lupinus angustifolius, Juglans regia, Vigna radiata, Medicago truncatula, Jatropha curcas, Phaseolus vulgaris, Brassica rapa*). As linhas em rosa e preto representam o grau de similaridade com a isca dos resultados produzidos pela busca.



**Figura 30. Resultado da busca (BLASTp) utilizando a proteína dnj-16 (378 aa) contra viridiplantae.** As linhas em vermelho representam o grau de similaridade com a isca dos resultados produzidos pela busca. As linhas pretas tracejadas representam a região de delimitação do domínio COA observado na proteína dnj-16.

5. DISCUSSÃO

### 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Hipergravidade

Diversos estudos têm se utilizado da ultracentrifugação para simular condições de hipergravidade (CASEY et al. 2012; KIM et al. 2016; TAMAOKI et al. 2014). Nesse sentido, algumas análises seminais realizadas por Beams e King (1936a) expuseram ovos de nematoides a condições similares às avaliadas nesse trabalho (400,000 x g por 1h). No entanto, em nossas buscas na literatura não encontramos estudos que caracterizaram a resistência de nematoides (adultos) a tais condições de gravidade, o que respalda o pioneirismo de nossas análises realizadas em *P. superbus* (SOUZA; CARLI; PEREIRA, 2017).

Dessa forma, considerando a importância de *C. elegans* como organismo modelo em diversas áreas da biologia e as implicações que a sua utilização para o estudo da resposta da vida multicelular ao espectro da hipergravidade representaria para os estudos em astrobiologia, o presente trabalho se propôs inicialmente a caracterizar os aspectos físicos e moleculares de *C. elegans* submetidos a 400.000 x g.

### 5.2. Aspectos físicos

A primeira e mais importante análise é a determinação da porcentagem de viabilidade de *C. elegans* submetido a 400.000 x g. A notória tolerância do mesmo a esse grau de estresse físico permitiu as posteriores análises do desenvolvimento, da morfologia (eventuais danos estruturais) e alterações comportamentais causadas pela ultracentrifugação. Possíveis alterações morfológicas e comportamentais em *C. elegans* causadas pela exposição a diferentes tipos de estresse estão largamente descritas na literatura, facilitando a realização de análises dessa natureza. (AILION, M.; THOMAS, 2000; GOLDEN; RIDDLE, 1982; HART, 2006; MOERMAN et al. 1982).

Curiosamente, centrifugações de  $3.000 \ge g$  por 1 min são frequentes em diversos momentos da manipulação de *C. elegans* no laboratório. É interessante ressaltar que os mesmos se apresentam muito ativos logo após este procedimento, algo intuitivamente inesperado já que a mesma força seria letal em seres humanos. Neste sentido, é notório ressaltar que os vermes apresentam agitação (natação em meio M9) aparentemente normal instantes após sua retirada da ultracentrífuga (400.000 x g), evidenciando que esta ultra-aceleração é inócua ao mesmo.

A ausência de quaisquer alterações na viabilidade, morfologia e comportamento verificados após o estresse de força g corrobora os dados apresentados por Kim e colaboradores (2007) que demonstraram que a exposição à hipegravidade (100 x g) não altera o comportamento e a estrutura muscular dos vermes. Os dados desse trabalho, no entanto, demonstraram que C.

*elegans* se encontra em patamar muito mais elevado de resiliência à hipergravidade e, considerando a inexistência de quaisquer alterações, provavelmente ele é capaz de suportar valores ainda mais elevados de força g. Eventuais danos estruturais internos causados pela ultracentrifugação não foram diretamente avaliados, mas se existirem não compromentem a viabilidade. É importante também ressaltar que os fenótipos induzidos por mudanças no espectro de gravidade tendem a desaparecer quando o organismo volta à 1 x g (KIM et al., 2007). Dessa forma, apesar dos esforços para analisar o comportamento de *C. elegans* logo após a exposição à 400,000 x g algumas alterações comportamentais podem ter passado despercebidas em função da plasticidade comportamental desse nematoide.

Nesse contexto, os resultados da análise de desenvolvimento tiveram especial importância, pois corroboraram os dados previamente citados. A ausência de alterações no crescimento populacional dos vermes submetidos às condições de hipergravidade 10 dias após a exposição indicou que ultracentrifugação a 400.000 x g não é capaz de afetar a viabilidade dos vermes a longo prazo, não impedindo o correto desenvolvimento dos vermes e por fim, não interferindo no seu potencial reprodutivo. Tomados em conjunto, estes dados *físicos* nos revelam não apenas que *C. elegans* é tolerante a tal ordem de estresse físico, mas também que possivelmente seu limite de tolerância a força g é muito maior (500.000 x g ou além).

Essa constatação nos motivou a estudos com outros organismos modelos, submetendo-os a condições similares para efeito comparativo (larvas de *Drosophila melanogaster* e sementes de *Nicotiana tabacum*, Apêndice XII).

### 5.3. Aspectos moleculares

Curiosamente, demonstrou-se que *C. elegans* é capaz de percepção da gravidade (OKUMURA; TANAKA; YOSHIGA, 2013), mas apenas poucos elementos celulares aparentemente envolvidos nesta mecanopercepção foram identificados quando o verme foi exposto a 100 x g (*e.g.*, fator de transcrição DAF-16/FoxO) (KIM et al. 2007).

Dessa forma, considerando que o conhecimento acerca dos genes responsivos a gravidade em *C. elegans* é extremamente escasso e que não há registros na literatura de análises do perfil de expressão gênica desse organismo após a exposição a forças  $>10^2 x g$ , nos propusemos a avaliar a expressão do gene *dnj-16* após a exposição a 400.000 x g. Adicionalmente a essa análise foi realizada uma caracterização da atividade metabólica de *C. elegans* em diferentes condições de hipergravidade (50 a 400.000 x g) proporcionando assim uma visão de alguns aspectos do metabolismo e genética relacionados à resposta a hipergravidade nessa espécie. Alterações no metabolismo podem ocorrer em resposta a vários fatores e são observadas em praticamente todos os filos do reino animal (GUPPY; WITHERS, 1999). A queda do metabolismo é mensurada por meio da razão entre a *taxa metabólica de depressão* e a *taxa metabólica de repouso*. Essa depressão metabólica pode variar muito, sendo que mais comumente ela representa uma queda de 60 a 95% em relação ao estado de repouso. No entanto essa queda pode ser maior que 99% em organismos anidrobiotos (GUPPY; WITHERS, 1999). No nematóide parasita *Anguina tritici*, por exemplo, a taxa metabólica de depressão pode chegar a 0,06% do metabolismo normal quando ele é submetido à dessecação extrema (GUPPY; WITHERS, 1999) apud BHATT; ROHDE, 1970).

Assim, considerando que o metabolismo dos vermes centrifugados caiu em função da centrifugação e que essa atividade metabólica permaneceu sem grandes alterações no espectro de hipergravidade (50 - 400,000 x g), constata-se surpreendentemente que o nematóide *C. elegans* é capaz de tolerar o estresse de 400.000 x g sem entrar em um estado mais profundo de depressão metabólica.

Visto de outra forma, este fato é totalmente inesperado e muito intrigante. Isto porque todo e qualquer estresse físico *extremo* até hoje testado nas diversas formas de vida promove a *queda do metabolismo* ou a *morte*. Por exemplo: baixas temperaturas ( $< 40^{\circ}$ C) inevitavelmente reduzem o metabolismo ao passo que elevadas temperaturas ( $>150^{\circ}$ C) são letais. Semelhantemente, a perda excessiva de água (dessecação extrema) leva a um estado ametabólico (anidrobiose), ao passo que a ingestão ininterrupta de água ou exposição a solução hipotônica (levando à entrada excessiva de água nas células) é fatal para o organismo. O mesmo pode ser observado para extremos de salinidade, pH, pressão atmosférica, etc - reduzem o metabolismo ou são letais. Nossos dados revelam algo novo: mesmo após submeter os vermes a uma força g cinco ordens de grandeza superior àquela naturalmente experimentada na Terra (1 x g), *C. elegans* permanece vivo e sem dramática redução do metabolismo.

A fim de verificar se a pequena redução metabólica observada nos grupos experimentais (50 - 400,000 x g) observada no ensaio de MTT estaria associada a alterações genéticas, avaliouse a expressão de *dnj-16* após a exposição a 400,000 x g. Curiosamente, *dnj-16* apresentou uma pequena queda de expressão, sugestiva de uma redução do metabolismo como um todo (bioquímico - MTT e genético - expressão gênica).

Tomados em conjunto com os dados de viabilidade, morfologia, desenvolvimento, comportamento e MTT, os dados genéticos corroboram que, de maneira totalmente inesperada,

forças da ordem de  $10^5$  x g são pouco estressoras sobre a biologia de *C. elegans* e promovem uma pequena redução da atividade celular.

O gene *dnj-16* é codificador de uma proteína *heat shock* em *C. elegans* e homólogo ao gene *ARG1* (<u>Altered Response to Gravity</u>) relacionado ao gravitropismo em Arabidopsis thaliana (HARRISON; MASSON, 2008). A resposta *heat shock* em *C. elegans* e outros organismos é mediada pelo fator de transcrição HSF1 (*Heat Shock Factor 1*) que regula a indução de proteínas *heat shock* em resposta a algum sinal de estresse (GUISBERT et al. 2013). Considerando que existem evidências de que a hipergravidade pode aumentar a expressão de proteínas *heat shock* (HIRASAKA et al. 2005; KIM et al. 2007; KOZEKO; KORDYUM, 2009), seria de se esperar que a expressão de *dnj-16* aumentasse em reposta à hipergravidade.

No entanto, o observado foi justamente o oposto. Neste cenário, poderíamos hipotetizar que a exposição à centrifugação gerou uma queda metabólica que se refletiu na diminuição da expressão do gene *dnj-16*, porém essa queda, comparativamente ao gene normalizador (*Y45F10D.4*) é um indício de que esse gene não possui função análoga ao gene *ARG1* de *A. thaliana*. Dessa forma, nos propusemos a investigar a natureza e possível função do gene *dnj-16* por meio de análises *in silico* dado que não existe nenhum fenótipo associado a esse gene que esteja descrito na literatura (FRUMKIN et al. 2004).

#### **5.4.** Aspectos evolutivos

### 5.4.1. Caracterização de dnj-16 e dos seus homólogos ARG1, ARL1 e ARL2

O gene dnj-16 foi encontrado inicialmente via tBLASTn utilizando a proteína ARG1 de A. thaliana como isca. O gene ARG1 está envolvido no gravitropismo positivo e no dobramento de proteínas (chaperona molecular). O produto deste gene é uma proteína DnaJ com homologia a coiled coils encontrados em polipeptídeos que interagem com o citoesqueleto (SEDBROOK et al. 1999). Outros dois genes, ARL1 e ARL2 codificam proteínas similares à ARG1. Os genes ARL1 e ARL2 também atuam como chaperonas moleculares e o gene ARL1 está relacionado à via de resposta ao ácido abscísico. Interessantemente, as proteínas codificadas por esses genes, assim como ARG1, estão envolvidas na via de gravitropismo de plantas (LUESSE et al., 2010; HARRISON 2008a,b). Semelhantemente aos seus homólogos em plantas ARG1, ARL1 e ARL2, o gene dnj-16 codifica uma proteína apresentando um domínio DnaJ e possui duas isoformas, a maior contendo 395 aa e a menor 378 aa. No entanto, a função de dnj-16 ainda não está elucidada e os dados de RT-qPCR sugerem que ele não está relacionado à resposta à gravidade em *C. elegans*. Ou seja, esse gene não possui função análoga à observada em seus homólogos de plantas.

A fim de se analisar a possível origem dessa diferença funcional foram inicialmente realizadas análises comparando as sequências das proteínas dnj-16, ARG1, ARL1 e ARL2. Nessas comparações foi utilizada a isoforma de dnj-16 de 378 aa por ser o melhor *hit* gerado a partir da busca utilizando a ferramenta BLASTp.

Como era esperado devido à semelhança indicada pelo BLASTp, o alinhamento das sequências de aminoácidos de dnj-16, ARG1, ARL1 e ARL2 demonstrou que essas proteínas apresentam grande semelhança nos domínios DnaJ, transmembrana e *coiled coil*. Como existem estudos analisando o fenótipo de mutantes dos genes ARG1, ARL1 e ARL2 foi verificado se alguma dessas mutações poderia explicar a ausência de responsividade de *dnj-16* à força *g*. Contudo, a maioria delas (*Arg1-1; Arg1-2; Arg1-3; Arl2-2; Arl2-3*) levam apenas a deficiências na resposta gravitrópica, sendo que somente a mutação *Arl2-3* resulta em ausência de resposta à gravidade na planta mutante (SEDBROOK et al., 1998, 1999, GLEESON et al., 2012). Notavelmente, *C. elegans* apresenta alterações na sequencia primária no sítio "C", correspondente ao mutante *Arl1-4*. Contudo, curiosamente, este mutante especificamente não apresenta alterações na resposta gravitrópica (GUAN et al., 2003). Assim, a análise da posição e do fenótipo resultante dessas mutações não permitiu explicar a ausência de resposta à gravidade observada na análise de expressão do gene *dnj-16* de *C. elegans*.

Ainda com o objetivo de elucidar a função do gene *dnj-16*, foi analisada a sequência do DnaJ, a qual é altamente conservada em toda árvore da vida. O domínio DnaJ está presente em diversas proteínas *heatshocks* observadas desde bactérias a humanos e está relacionado com a função de chaperona molecular nesses organismos (CAPLAN et al. 1993; QIU et al. 2006). A similaridade das proteínas dnj-16, ARG1, ARL1 e ARL2 quanto a este domínio seria compatível com seu papel na gravipercepção.

Em seguida analisamos o domínio transmembrana, formado por resíduos de aminoácidos não polares que podem atravessar a bicamada uma ou várias vezes (ALBERS et al., 2012). O domínio transmembrana foi detectado pelo software Phobius, porém de forma bem discreta quando comparado com proteínas conhecidamente transmembrana, como a sid1 (WINSTON et al. 2012). A similaridade das proteínas dnj-16, ARG1, ARL1 e ARL2 quanto a este domínio também seria compatível com seu papel na gravipercepção.

Por fim, foi analisado o domínio *coiled coil*, que é formado por motivos estruturais formados por 2 a 7 estruturas secundárias do tipo alfa-hélices enroladas em conjunto como os fios

de uma corda (LIU et al. 2006). A presença do domínio *coiled coil* foi detectada com auxílio do software Prabi e as estruturas *coiled coil* das 4 proteínas demonstraram ser muito similares, o que é um indicativo que a ausência de responsividade do gene *dnj-16* à gravidade não se deve à modificações nesse domínio. Como não foram observadas grandes diferentes entre as proteínas ARG1, ARL1 e ARL2, as análises seguintes se concentraram na comparação entre ARG1 a sua homóloga dnj-16.

Levando em conta a grande similaridade das sequências de aminoácidos, era de se esperar que as proteínas ARG1 e dnj-16 possuíssem redes de interação similares. No entanto, apesar de ambas potencialmente interagirem com diversas proteínas *heat shock*, incluindo a HSP70, foi observado várias diferenças em suas redes de interação. Em *Arabidopsis*, por exemplo, a HSP70 aumenta em abundância em uma fração bioquímica que inclui proteínas associadas à membrana extraídas das pontas de raiz durante a gravi-estimulação (HARRISON & MASSON, 2008a). No entanto, é importante ressaltar que outros genes relacionados ao gravitropismo em plantas não possuem homólogos em *C. elegans*, o que explicaria em parte a ausência de indução de *dnj-16* em resposta à gravidade.

### 5.4.2. Origem do gene dnj-16 de C. elegans

Surpreendentemente, a grande semelhança das sequências proteicas de ARG1 e dnj-16 não é acompanhada pela semelhança nas sequências nucleotídicas, o que a princípio indicou a provável existência de uma pressão seletiva que estaria atuando para a manutenção da estrutura dessas proteínas. Considerando os dados das análises até aqui descritas passou-se a considerar que as similaridades entre essas proteínas poderiam ser explicadas por três hipóteses distintas: (i) convergência, (ii) homologia e (iii) transferência gênica horizontal.

Na hipótese de convergência evolutiva ou homoplasia, a semelhança entre as proteínas ARG1 e dnj-16 seria explicada por meio de um paralelismo evolutivo de sequências nucleotídicas que não possuem ancestralidade comum, mas estariam sob pressões seletivas similares. Já a hipótese de homologia consideraria que a semelhança dessas proteínas seria devido à ancestralidade comum de suas sequências nucleotídicas, e que (eventuais) ausências desta proteína em outros organismos distribuídos em diferentes táxons da árvore da vida seriam devidas a deleções gênicas ao longo do tempo. Por fim, a hipótese da transferência gênica horizontal (TGH) explicaria a semelhança entre essas sequências proteicas recorrendo a eventos pontuais de transferência de sequências gênicas (DNA/RNA) entre diferentes organismos, provavelmente no

caso considerado, entre plantas e nematoides. Dessa forma, foram realizadas várias análises *in silico* a fim e eleger qual dessas três hipóteses seria mais plausível para explicar a semelhança entre as proteínas ARG1 e dnj-16.

# 5.4.3. Análises filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas e proteicas de *ARG1* e *dnj-16*.

Inicialmente, foi realizada uma busca por meio da ferramenta BLASTp utilizando a sequência proteica de dnj-16 como isca. Os 100 melhores *hits* obtidos em função dessa busca foram utilizados para realizar análises filogenéticas. Curiosamente, esses *hits* corresponderam quase que em sua totalidade a proteínas encontradas em plantas, nematoides e oomicetos parasitas com a exceção de duas espécies de algas (*Ectocarpus siliculosus, Nannochloropsis gaditana*), duas espécies de crustáceos (*Caligus rogercresseyi, Lepeophtheirus salmonis*) e um inseto parasita (*Myzus persicae*). Interessantemente, a alga filamentosa marrom *Ectocarpus siliculosus* apresenta parede celular, metabolismo e resposta à fotossíntese e fototropismo similares aos observados em plantas terrestres (KLOAREG & QUATRANO, 1988; LE BAIL et al. 2010). Tanto *Ectocarpus siliculosus* quanto *Nannochloropsis gaditana* pertencem ao filo Heterokontophyta, o qual também inclui oomicetos. *Caligus rogercresseyi e Lepeophtheirus salmonis* são crustáceos pertencentes à ordem *Siphonostomatoida* sendo conhecidos por parasitar peixes. Curiosamente, as algas marrons (diatomáceas) fazem parte da dieta de alguns peixes (EGAN et al. 2017).

Além disso foi realizada outra busca por meio do tBLASTn utilizando também a proteína dnj-16 (378 aa) como isca. Assim como o observado no BLAStp, a quase totalidade das espécies obtidas nesses *hits* foram de plantas, nematoides e oomicetos. Os mesmos parasitas de peixes *Caligus rogercresseyi* e *Lepeophtheirus salmonis* foram observados nessa busca, reforçando a semelhança entre as sequências encontradas nesses organismos e o gene *dnj-16*. No entanto, o mais intrigante foi observar que um grande número dos oomicetos e nematoides observados no BLASTp e no tBLASTn se tratam de parasitas. Dentre esses parasitas, as espécies do gênero *Phytophthora* receberam especial atenção pois possuem o potencial de parasitar nematoides, como a espécie *Phytophthora palmivora*. O parasitismo se dá quando o nematóide ingere zoosporos e esses se desenvolvem em hifas dentro do corpo desse verme (TZEAN & ESTEY, 1981). Além do BLASTp e tBLASTn foi realizado um BLASTn utilizando como isca o CDS do gene *dnj-16*. No entanto, devido à baixa similaridade entre as sequências nucleotídicas dos homólogos de *dnj-16*, os melhores *hits* se limitaram a algumas espécies de nematoides.

Dessa forma, apenas a filogenia gerada a partir dos dados de BLASTp foi informativa para a análise da origem do gene *dnj-16*. As análises filogenéticas previamente descritas foram extremamente úteis no sentido de avaliar as hipóteses previamente apresentadas para explicar a origem do gene *dnj-16*. Caso a hipótese de homologia fosse a mais adequada, era de se esperar que sequências homólogas do gene *dnj-16* fossem encontradas distribuídas de forma homogênea ao longo de diversos grupos filogeneticamente próximos, no entanto, isso não foi observado.

Portanto, os dados das análises filogenéticas dão maior respaldo às hipóteses de convergência e de TGH. Mais especificamente, o grande número de espécies parasitas e as relações ecológicas observadas entre as espécies encontradas nas buscas por BLASTp e tBLASTn sugerem a ocorrência de eventos de TGH entre elas como a explicação mais provável para a semelhança encontrada entre a sequência de *dnj-16* e dos seus homólogos em plantas e oomicetos. Considerando os dados obtidos por meio do BLASTp e tBLASTn, a sequência de *ARG1*, presente em *A. thaliana* ou *Glycine max* teria sido incorporada por um oomiceto parasita do gênero *Phytophthora* (possivelmente *P. sojae*) e o esporo desse oomiceto, por sua vez, teria sido ingerido por um nematóide e transferido a sequência de *ARG1* para o genoma desse verme, resultando na presença de um gene originalmente endógeno de plantas no genoma de *C. elegans*, o *dnj-16*.

No entanto, inicialmente, a hipótese de homologia não pode ser descartada em função desses dados pois pode haver ocorrido perdas secundárias de sequências homólogas a *dnj-16* em outros organismos da árvore da vida não encontrados em nossas buscas. Ademais, a hipótese de convergência também não pode ser ignorada em função desses dados, pois a partir das relações ecológicas observadas em alguns dos organismos previamente citados pode-se inferir que alguns deles compartilham habitats, estando sob pressões seletivas similares, o que permitiria a evolução de proteínas com funções semelhança.

### 5.4.4. Análise das regiões flanqueadoras do gene dnj-16

A fim de analisar mais a fundo a natureza do possível evento de TGH descrito no item anterior, a natureza das regiões que flanqueiam o gene *dnj-16* foram analisadas. Um possível evento de TGH do gene *dnj-16* poderia incluir não apenas a sequência desse gene, como também outros genes e sequências *up* e *downstream*, transferidos como uma unidade (conservação de sintenia). Dessa forma, foi realizado um tBLAStx entre 2 genes *upstream* a *dnj-16* (no cromossomo de *C. elegans*) e 1 gene *downstream* (*xbp-1*) contra a região que envolve 2 genes *upstream* à região

homóloga à *dnj-16* no cromossomo de *Phytophthora infestans*, (genes PITG\_19126, PITG\_19127) e 1 gene *downstream* (PITG\_19129) (região genômica (282.400-288.500 de NW\_003303684.1).

A análise demonstrou que a similaridade entre essas sequências se limita à região do gene *dnj-16*, não havendo evidências de conservação de sintenia. O fato de não observarmos sintenia, nem mesmo de genes muito próximos a *dnj-16*, sugere que a TGH envolveu pequenos fragmentos de ácido nucléico ou um fragmento maior, que foi perdido ao longo da evolução, sendo mantido apenas o *dnj-16*. Este último foi então endogeneizado e passou a executar um papel biológico em *C. elegans*. A conservação de sintenia tende a ser observada nos casos de homologia, pois o lento processo evolutivo permite que duas ou mais espécies derivadas de um ancestral comum mantenham os genes flanquedores funcionais. Por outro lado, dificilmente todos os genes transferidos durante um repentino evento de TGH necessariamente seriam endogeneizados. Entretanto, apesar das evidências até aqui apresentadas corroborarem a hipótese de TGH, as hipóteses de homologia e convergência ainda não podiam ser descartadas.

### 5.4.5. Análise do codon usage e do conteúdo de GC

A hipótese de TGH descrita no ítem 5.4.4. considera a presença de *hits* da soja (*Glycine max*) e do seu parasita oomiceto nas análises por BLASTp e tBLASTn como indicativos de que essas espécies provavelmente estariam relacionadas com a presença do gene *dnj-16* em *C. elegans*. A fim de testar a hipótese de TGH foi realizada uma análise do *codon usage* de *dnj-16* e de seus homólogos em *A. thaliana*, *Glycine max* e *Phytophtora sojae* utilizando como controle as proteínas histona 4 (his4) e actina 1 (actin-1), as quais são altamente conservadas ao longo da árvore da vida (Apêndice VI). A análise do *codon usage* de determinada sequência nucleotídica informa a frequência de uso de cada códon, algo que é específico para cada espécie. Assim, é possível verificar se determinado gene em estudo apresenta um *codon usage* compatível com o genoma no qual se encontra atualmente, ou se ele é mais próximo a outra espécie filogeneticamente distante, da qual ele poderia ter vindo via TGH.

No entanto, apesar de ser uma estratégia interessante para se avaliar essa hipótese, devido ao pequeno tamanho do CDS de *dnj-16* e dos seus homólogos em *A. thaliana*, *G. max* e *P. sojae* a análise não foi informativa. Essa mesma limitação afetou também a análise do conteúdo de GC dessas sequências. A porcentagem de GC do CDS de *dnj-16* (41,2%), por exemplo, foi muito similar a quantidade observada em *C. elegans* (42,92%), *A. thaliana* (44,59%) *e Glycine max* (45,95%) (Apêndice VII).

### 5.4.6. Estrutura do gene dnj-16 e dos seus homólogos na espécies do gênero Phytothphtora

Como descrito anteriormente, o gene dnj-16 possui duas isoformas distintas. A isoforma mais longa possui 6 éxons e 5 íntrons enquanto que a isoforma menor é constituída por 5 éxons e 4 íntrons e resultam em proteínas de 395 e 378 aa, respectivamente. Considerando a hipótese de TGH descrita no item 5.4.4, a estrutura dos genes homólogos a dnj-16 nas espécies do gênero Phytothphtora presentes nos resultados das buscas por BLASTp e tBLASTn (P. parasitica, P. infestans e P. sojae) foram analisadas. Interessantemente, foi verificado que nessas espécies de oomicetos as sequências homólogas ao gene dnj-16 não apresentavam íntrons. Essa observação foi inesperada dado que dnj-16 e os seus homólogos em A. thaliana e G. max apresentam íntrons. Dessa forma, passou-se a considerar a possibilidade de que a transferência do gene ARG1 para Phytothphtora ocorreu via RNA (vide Apêndice XV). Isto é, após ingerirem esses oomicetos, os nematóides absorveram seus materiais celulares (entre eles, moléculas de RNA que em algum momento passaram por um evento de transcrição reversa acidental) e incorporaram essa sequência de DNA no seu genoma. Ao longo do tempo, íntrons teriam surgirdo de novo nos nematoides. Essa hipótese é corroborada por dois fatos adicionais: (i) não há conservação de sintenia entre plantas e oomicetos (assim como esperado em eventos de transferência horizontal mediada por RNA) e (ii) apesar de dnj-16 não possuir íntrons, os genes que o flanqueiam em P. parasitica, P. infestans e P. sojae possuem, sugerindo uma possivel origem distinta para dnj-16.

### 5.4.7. Análise das regiões reguladoras de dnj-16

### 5.4.7.1. Região promotora

Ao considerar uma TGH mediada por RNA, processo este que tipicamente não envolve a transferência de sequências promotoras, o estudo sobre a origem e natureza da região reguladora de *dnj-16* em nematoide foi realizada. Após analisar a estrutura do gene *dnj-16* no Wormbase observou-se que existem vários sítios de ligação de fatores de transcrição no primeiro íntron desse gene. Essa observação foi inesperada e levou à hipótese de que aquele íntron teria, na verdade, uma função reguladora e devido à sua posição, poderia ser o próprio promotor do gene *dnj-16*.

No entanto, a presença de um éxon localizado *upstream* a esse íntron potencialmente dificultava a validade dessa interpretação. Assim, no sentido de elucidar essa questão, foram analisados os dados de RNA Pol CHiP-seq disponibilizados pelo WormBase, os quais claramente

indicam que a isoforma que não contém o primeiro éxon (378 aa) é muito mais expressa do que a isoforma que o contém (395 aa).

Na tentativa de se rastrear a origem evolutiva deste primeiro íntron diversas análises via BLAST foram executadas, considerando hipóteses tais como sua derivação a partir da 5'UTR do mRNA envolvido na TGH; contudo nenhuma delas foi informativa (*e-values* não significativos).

Uma questão intimamente associado a este primeiro íntron como promotor se refere ao éxon que o antecede na isoforma de 395 aa. Este éxon codifica apenas 12 aminoácidos, sendo muito menor do que os demais éxons dessa isoforma. Somado a isso, a busca (tBLASTn) utilizando como isca a isoforma de 395 aa contra viridiplantae mostra que praticamente nenhum dos *hits* gerados contém os resíduos de aminoácidos 1-12, que correspondem a esse primeiro éxon. Ou seja, a explicação mais plausível é a de que o primeiro íntron dessa isoforma seja um promotor e o éxon que o antecede provavelmete surgiu *de novo* em nematoides, agregando 12 aa que não são encontrados em plantas.

Análises adicionais foram realizadas para avaliar a origem deste primeiro éxon da isoforma de 395 aa de *dnj-16*. Neste sentido realizou-se um BLASTp dos 12 aa que formam esse éxon contra a coleção de nucleotídeos (nr) sem especificar um grupo taxonômico ou espécie. O resultado mostrou que apenas *C. elegans* possui essa sequência, corroborando a hipótese de que esses 12 aa teriam surgido *de novo* nesse nematóide. Nesse contexto, outras buscas (BLASTp, tBLASTn) utilizando essa pequena sequência de aminoácidos como isca contra viridiplantae não encontraram *hit* algum. Enquanto que uma busca via tBLASTn (sem especificação taxonômica) indicou apenas 1 *hit* em *C. elegans*.

Em síntese, os dados evidenciam que o primeiro íntron é o promotor do gene (Apêndice XIII, Figura 1,2), mas sua origem precisa (possivelmente a 5'UTR do mRNA de plantas) não pode ser validada; já o primeiro éxon que o antecede parece ser uma novidade evolutiva exclusiva de nematoides.

### 5.4.7.2. Sítios de terminação

Após a caracterização da região promotora de *dnj-16*, buscou-se também identificar a natureza do sítio de terminação desse gene. De maneira oposta a regiões promotoras, as regiões terminadoras (ou parte delas) podem sim ser transferidas durante TGH mediada por RNA. Dessa forma, foram realizadas buscas por sítios de poliadelinação na 3'UTR de *dnj-16* (APÊNDICE XIV). Inicialmente, essas buscas foram realizadas utilizando o software *Poly(A) Signal Miner* e

mostraram que o íntron 1 (usado aqui como um controle) não possui sítios de poli-adelinação enquanto que a 3'UTR possui 1 sítio (AAUAAA).

Interessantemente, tomando por base as classificações propostas por Shen e colaboradores (2008), foram identificados 25 elementos associados a terminadores de plantas nessa região (FUE (*far upstream elements*), NUE (*near-upstream element*) e CE (*coordinate cleavage site*)), muitos dos quais parcialmente sobrepostos. A partir da identificação desses elementos foi elaborado um modelo no intuito de organizar visualmente as regiões de terminação presentes nessa região. Esses dados em conjunto são sugestivos de que o terminador seja de *origem vegetal*, corroborando adicionalmente para hipótese de TGH. Ademais, a sequência AAUAAA e a região rica em GU (que são típicos de animais) poderia evidenciar um processo de endogeneização.

### 5.4.8. Aspectos evolutivos da TGH de dnj-16

Se realmente houve um evento de TGH onde estiveram envolvidos plantas, oomicetos e nematóides é preciso analisar qual tipo de pressão seletiva atuou nessas sequências ao longo do tempo para que as proteínas expressas por elas possuíssem tamanha semelhança. Inicialmente foi realizado o teste Z para evolução neutra, o qual rejeitou a hipótese de neutralidade, ou seja, de que o número de mutações sinônimas que ocorreram após a TGH é igual ao número de mutações não sinônimas. Por fim, foi realizado o teste Tajima (TAJIMA, 1989), o qual apontou para a existência de uma seleção balanceadora atuando sobre *dnj-16*, compatível com uma endogeneização pós TGH.

Determinada o tipo de seleção que provavelmente atuou sob *dnj-16*, foi necessário abordar as hipóteses de convergência e homologia levantadas no item 5.4.3. que apesar de não serem respaldadas pelos dados até aqui discutidos, serão brevemente analisadas. Em relação à hipótese de homologia foi observado que as porcentagens de divergência média de identidade (DMI) e a divergência média de similaridade (DMS) entre os genes *ARG1* e *dnj-16* se demonstraram semelhantes às de outras proteínas que são conhecidamente homólogas. Apesar desse teste em si não refutar a hipótese de homologia, esta última se torna muito improvável pois demandaria uma perda dos genes homólogos a ARG-1 *em todos os outros grupos taxonômicos* com exceção de nematoides, plantas e oomicetos.

Assim restaram ainda duas hipóteses: de convergência e de TGH. Notavelmente, a análise detalhada da proteína dnj-16 (378 aa) no "*Conserved Domains*" do NCBI nos revelou a inesperada presença do domínio *clorofila a oxigenase* (COA) (MARCHLER-BAUER et al., 2017), típico de

plantas, nessa proteína. A proteína COA é produzida no cloroplasto e está envolvida na síntese de clorofila e no metabolismo de porfirina (<u>http://www.uniprot.org/uniprot/Q9MBA1</u>), sendo assim, não era esperado que um domínio COA estivesse localizado em *dnj-16*, que é um homólogo de sequências relacionados à resposta gravitrópica em plantas.

Após essa descoberta intrigante foram realizadas análises para investigar se o domínio COA também estaria presente nas sequências homólogas a *dnj-16* nas espécies do gênero *Phytophtora*. Diversas buscas realizadas por meio do BLAST utilizando a sequência de COA como isca contra *Phytophtora* não produziram nennhum *hit*. Assim, foram realizadas buscas (tBLASTn) utilizando uma sequência formada apenas pela junção entre o domínio DnaJ e COA. O tBLASTn utilizando como isca a sequência proteica quimérica DnaJ (de *C. elegans*)::COA (de plantas), por exemplo, foi capaz de identificar resquícios (baixa homologia) do domínio COA em *P. infestans* e *P. parasitica*, enquanto que a mesma análise utilizando uma sequência não quimérica DnaJ (de *C. elegans*)::COA (de *C. elegans*) foi incapaz de identificar COA nessa espécie. Todavia, é importante ressaltar que a COA de *Phythophthora* é identificável apenas via isca com COA de plantas. Isto, em conjunto, sugere que COA veio de plantas, passou rapidamente para *C. elegans*, o qual manteve parcialmente a sequência, ao passo que em *Phythophthora* ela praticamente se perdeu por mutações.

A ausência de conservação do domínio COA no gene *ARG-1* de plantas e em *Phytophtora* sugere que COA foi transferido para ARG-1 (ainda dentro de plantas), depois para *Phytophtora* e posteriormente para *C. elegans* de forma relativamente rápida. Após a TGH a sequência foi conservada em *C. elegans* enquanto se descaraterizava em plantas e *Phytophtora*. Outra hipótese para a presença do domínio COA em *dnj-16* seria que apenas ele teria vindo por meio de TGH e que o restante do gene seria conservado em diferentes espécies. No entanto, uma busca (BLASTp) realizada utilizando como isca o domínio DnaJ, que é a sequência mais conservada da proteína dnj-16, gerou o mesmo resultado observado na filogenia gerada a partir do BLASTp utilizando toda a sequência da proteína: plantas, oomicetos e nematóides. Isso demonstra que toda a sequência do gene *dnj-16* seria fruto de uma TGH e não apenas o domínio COA.

Além dessas análises foi realizado um BLASTp da sequência fusionada do domínio DnaJ de *C. elegans* com o domínio COA de plantas contra 10 espécies de plantas, que apontou para resquícios da presença desse domínio nas sequências homólogas a *dnj-16* em algumas dessas espécies de plantas. Ademais, um BLASTp utilizando como isca a proteína dnj-16 (378 aa) contra viridiplantae evidenciou que o BLAST consegue detectar o domínio COA (região 280-353 aa) como uma região de alta similaridade.

Assim, a presença do domínio COA em *dnj-16* exclui difinitivamente as plausibilidades das hipóteses de homologia e convergência; corroborando claramente para a interpretação até aqui exposta: TGH como a origem evolutiva de *dnj-16* em *C. elegans*. Em especial, a existência de proteínas virtualmente idênticas em grupos filogeneticamente muito distintos (plantas, oomicetos e nematoides) porém ecologicamente relacionados (plantas são infectadas por oomicetos, oomicetos são ingeridos por nematoides) é compatível com os típicos eventos de transferência gênica horizontal, os quais envolvem 'íntima proximidade física' entre as espécies.

Algumas questões adicionais podem ser levantadas: (i) Quando teria ocorrido esse evento de TGH? (ii) Seria ele compatível com a história evolutiva de nematóides?

Para estimar o tempo de ocorrência desse evento de TGH é preciso levar em consideração que o ciclo de vida de *C. elegans* dura cerca de 4 dias (MUSCHIOL et al. 2009), enquando que o ciclo de *P. infestans* dura cerca de 5 dias (COLON et al., 1995) e que a taxa de mutação de *C. elegans* é de 3 x 10<sup>-9</sup> base/geração (DENVER et al. 2009) enquanto que a de *P. infestans* é de ~1,5 x 10<sup>-9</sup> base/geração (inferida a partir do protozoário *Paramecium tetraurelia*) (SUNG et al., 2012).

Considerando esses dados e as diferenças observadas entre a sequência nucleotídica de *dnj-16* e do seu homólogo em *P. infestans* calcula-se que o evento tenha ocorrido há 1325 milhões de anos (ma). Já os dados baseados na diferença média de identidade (DMI) de aminoácidos entre as sequências proteicas de ARG-1 e dnj-16 sugere que o evento tenha acontecido 1565 ma atrás. Dessa forma, a TGH teria ocorrido pouco tempo depois da divisão dos grandes grupos (plantas, fungos e animais) possivelmente 1600 ma atrás (WANG et al. 1999). No entanto, é preciso ressaltar que a exatidão do relógio molecular depende da presença de uma seleção neutra atuando nas sequências ao longo do tempo (KIMURA, 1991, ZDOBNOV et al. 2005) e os testes de neutralidade rejeitaram a validade da teoria neutra para explicar a evolução molecular de *dnj-16* e *ARG1*. Além disso, o teste Tajima apontou para a existência de seleção balanceadora atuando sobre esses genes, dessa forma não há evidências que esses genes estiveram exclusivamente sob seleção neutra após a TGH.

### 5.4.9. C. elegans: um novo modelo de estudo para resposta à hipergravidade

*C. elegans* é um dos primeiros metazoários utilizados como um organismo modelo (KALICHAMY et al. 2016). Por meio desse nematoide, descobertas seminais acerca dos mecanismos que governam a RNAi, os miRNAs e a morte celular programa foram realizadas (FIRE et al., 1998; HENGARTNER & HORVITZ, 1994; LEE, FEINBAUM & AMBROS, 1993).
Mais recentemente uma nova gama surpreendente de eventos foram reportados, tais como: o desenvolvimento de um modelo de epilepsia (apresentando convulsões e sensível a tratamentos com drogas) (WILLIAMS, et al. 2004), a identificação de um estado semelhante ao sono (*sleep-like state*) (RAIZEN, et al. 2008), a tolerância à dessecação extrema (ERKUT et al., 2011) e identificação de células fotossensíveis (WARD, et al. 2008).

Os dados obtidos por nosso grupo de pesquisa revelam pela primeira vez que esta espécie modelo amplamente utilizada no mundo inteiro possui mais uma característica intrigante em seu repertório biológico: a tolerância a hipergravidade extrema. As análises físicas evidenciam claramente que *C. elegans* suporta sem dificuldades forças de 400.000 x *g* por 1h. Talvez mais impressionante seja o fato de o metabolismo e a expressão gênica aparentemente não serem dramaticamente afetados por um estresse físico de tal magnitude. O comportamento da vida unicelular e multicelular em condições de hipergravidade nos auxilia a desvendar os limites do espectro gravitacional compatível com a vida. Isso nos permite analisar a plausibilidade da hipótese de que a vida como conhecemos possa existir em outros planetas e possa viajar no espaço a fim de colonizar locais outrora inóspitos. Cogitando essa possibilidade, Melosh (1993) calculou a força *g* que a vida presente em um fragmento vulcânico de Marte teria de suportar durante a sua aceleração em direção ao espaço. Utilizando simulações computacionais ele chegou à conclusão de que a máxima aceleração de ejeção prevista para um fragmento rochoso expelido por atividade vulcânica em marte seria de 300.000 x *g*.

Estudos recentes têm demonstrado que a vida unicelular pode resistir a essa magnitude de força g. Deguchi e colaboradores, por exemplo, demonstraram que as bactérias *Pseudomonas denitrificans* e *E. coli* são capazes de proliferar a 403.627 x g (DEGUCHI et al. 2011). Outro estudo, analisando *Chlamydomonas sp* comprovou que essa alga unicelular é capaz de sobreviver e se proliferar a 670.000 x g, sendo esse o maior valor de força g testado em um organismo vivo da qual temos conhecimento (GAO et al. 2013).

Qual é o limite máximo de tolerância de *C. elegans*? Qual é o limite máximo de tolerância de qualquer organismo vivo? Essas são perguntas que permanecem sem resposta. O desenvolvimento de ultracentrífugas, capazes de chegar até mesmo a maravilhosos 1 bilhão de *g* (GRAY, 1951) são instrumentos-chave nessa busca. Em síntese, nossos dados físicos revelam claramente a viabilidade do uso de *C. elegans* como um novo modelo para o estudo dos efeitos da hipergravidade na biologia (APÊNDICE XVI) Conjuntamente aos dados moleculares preliminares, propomos que *C. elegans* seja tolerante a forças *g* ainda muito elevadas ( $10^6 \times g$  ou além), de tal forma que as condições aqui testadas ( $10^5 \times g$ ) são pouco estressoras,

consequentemente não levando a alterações dramáticas no metabolismo. Por fim, as extensões científico-filosóficas deste trabalho ampliam nossa compreensão da vida e a sua possível existência em outros lugares no universo (astrobiologia).

#### 5.4.10. Síntese

Além de representar um avanço para o campo da astrobiologia, a constatação de que *C.* elegans é resistente à 400,000 x g e a posterior caracterização dessa resistência suscitou curiosidade acerca da natureza desse gene, o que resultou na elucidação de um interessante processo de TGH o qual teria dado origem à dnj-16 a partir da transferência horizontal de ARG1 de plantas para *C.* elegans mediada por oomicetos parasitas. Interessantemente, existem relatos na literatura de *C.* elegans sendo parasitado por oomicetos (PARK et al., 2002). Nesse contexto, é importante ressaltar que as relações ecológicas entre plantas, oomicetos e *C. elegans* se contrapõem às suas distâncias filogenéticas, permitindo assim que TGHs ocorram (Figuras 31 e 32), resultando na presença de sequências nucleotídicas e proteicas semelhantes nesses organismos. Além disso, os dados de RT-qPCR apresentados nesse trabalho demonstram que apesar de não ser induzido a 400.000 x g, o gene dnj-16 é expresso e apresenta uma função ainda desconhecida em *C. elegans*. Dessa forma, tomados em conjunto, os dados suportam a hipótese que dnj-16 seria derivado de eventos de TGH ocorridos a muito tempo atrás (1325-1565 ma), o que é compatível com a parcial descaracterização do domínio clorofilidae em ARG1 e na sequência homóloga à dnj-16 das espécies do gênero *Phytophtora*.



**Figura 31. Modelo proposto de eventos de TGH responsáveis pela origem de** *dnj-16* em nematoides. TGH (Transferência Gênica Horizontal), cpDNA (DNA de cloroplasto), nDNA (DNA nuclear). Fonte: (Planta- modificado de <u>http://knowpulse.usask.ca/portal/node/7</u>; Célula – modificado de https://compartments.jensenlab.org/; Oomiceto – modificado de Nicholls (2004), C. elegans – modificado do WormAtlas.



Figura 32. Estrutura (éxons e introns) do gene *dnj-16*. Os éxons são indicados em roxo e os introns em cinza. A natureza do primeiro éxon, do primeiro íntron e da provavel região terminadora também estão indicadas no esquema. Fonte: Wormbase.

# 6. CONCLUSÕES

### 6. CONCLUSÕES

Em função dos dados apresentados nesse trabalho (Figura 33) pode-se concluir que:

I. *C. elegans* resiste à exposição a 400.000 x g por 1h a 4°C; podendo então ser utilizado como um novo modelo para estudos dos efeitos da hipergravidade extrema na biologia (populacional, do organismo, comportamental e molecular);

II. C. elegans possui homólogos a genes conhecidamente responsivos à gravidade em plantas;

III. O gene *dnj-16* não é induzido mediante a aceleração de 400.000 x g por 1h a 4°C;

IV. *dnj-16* de nematoides tem sua origem a partir de eventos de transferência gênica horizontal (TGH);

V. Estes eventos de TGH envolveram três grupos: plantas, oomicetos e nematoides, todos ecologicamente relacionados;

VI. Um desses eventos de TGH provavelmente foi mediado por RNA;

VII. O primeiro éxon de *dnj-16* de *C. elegans* é uma novidade evolutiva deste grupo.



**Figura 33. Esquema ilustrativo das principais conclusões obtidas a partir dos resultados do presente trabalho.** As conclusões estão resumidamente descritas (vermelho) e as metodologias que permitiram chegar à elas estão citadas logo abaixo (cinza). MOLI – Microsópio Óptico de Luz Invertida. Fonte: (Planta - modificado de <u>http://knowpulse.usask.ca/portal/node/7</u>; Célula – modificado de <u>http://www.planetabio.com/citoplasma.html</u>; Oomiceto – modificado de Nicholls (2004), *C. elegans* – modificado do WormAtlas.



### 7. REFERÊNCIAS

AILION, M.; THOMAS, J.H. Dauer formation induced by high temperatures in Caenorhabditis elegans. **Genetics** 156, v. 1047-1067, 2000.

ALBERS R. R. W. W. Cell Membrane Structures and Functions In: Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology, ed. 8, p. 26–39, 2012.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, p. 195-201, 2006.

BARRACLOUGH, R. M.; FRENCH, N. Observation on the orientation of Aphelenchoides ritzemabosi (Schwartz). Nematologica, v. 11, p. 199-206, 1965.

BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; DE BEER, T. A.; TAURIELLO, G.; STUDER, G.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. **Nucleic Acids Research**, v. 45, (D1):D313-D319, 2017.

BEAMS, J. W.; WEDD, A. J. A simple ultracentrifuge. Science, v. 74, p. 44-46, 1931.

BEAMS, H. W., KING R. L. Effects of ultracentrifuging on the mitochondria of the hepatic cells of the rat. **The Anatomical Record** v. 59, p. 395, 1934.

BEAMS, H. W.; KING, R. L. The effects of ultracentrifuging on the cells of the root tip of the bean. **Nature**, v. 135, p. 232, 1935a.

BEAMS, H. W.; KING, R. L. The effects of ultracentrifuging the spinal ganglion cells of the rat, with special reference to Nissl bodies. **Journal of Comparative Neurology**, v. 61, p. 175, 1935b.

BEAMS H. W.; KING R. Survival of Ascaris eggs after centrifuging. Science, v. 84, v. 138, 1936a.

BEAMS, H. W.; KING, R. L. The effect of Ultracentrifuging upon Chick Embryonic Cells, with Special Reference to the Resting Nucleus and the Mitotic Spindle. **Biological Bulletin**, v. 71, p. 188-198, 1936b.

BEAMS, H. W.; KING, R. L. The suppression of cleavage in ascaris eggs by ultracentrifuging. **Biological Bulletin**, v. 73, p. 99-111, 1937.

BEAMS, H. W. Some Effects of Centrifuging upon Protoplasmic Streaming in Elodea. **Biological Bulletin**, v. 96, p. 246-256, 1949.

BELTRÁN-PARDO, E.; JÖNSSON, K. I.; WOJCIK, A.; HAGHDOOST, S.; HARMS-RINGDAHL, M.; BERMÚDEZ-CRUZ, R. M.; BERNAL VILLEGAS, J. E. Effects of ionizing radiation on embryos of the tardigrade Milnesium cf. tardigradum at different stages of development. **PLOS ONE** 8 (9): e72098, 2013. BÉZIAT, C.; BARBEZ, E.; FERARU, MI.; LUCYSHYN, D.; KLEINE-VEHN, J. Light triggers PILS-dependent reduction in nuclear auxin signalling for growth transition. **Nature Plants,** v. 3, n. 17105, 2017.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information **Nucleic Acids Research**, v. 42 (W1): W252-W258, 2014.

BOUCK, G. B. Na examination of the effects of ultra-centrifugation on the organelles in living root tip cells. **American Journal of Botany**, v. 50, p.1046-1054, 1963.

BORDOLI, L.; KIEFER, F.; ARNOLD, K.; BENKERT, P.; BATTEY, J.; SCHWEDE, T. Protein structure homology modelling using SWISS-MODEL Workspace. **Nature Protocols**, 4,1. 2009.

BRADAMANTE, S.; BARENGHI, L.; VERSARI, S.; VILLA, A. From hypergravity to microgravity: Choosing the suitable simulator. **Microgravity - Science and Technology**, v.18, n. 3, p. 250–253, 2006.

BRENNER, S. The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

CAMPBELL, P.; BRAAM, J. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 9, n. 361-6, 1999.

CAPLAN, A. J.; CYR, D. M.; DOUGLAS, M. G. Eukaryotic homologues of Escherichia coli dnaJ: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins". **Molecular Biology of the Cell**, v. 4, n. 6, p. 555–63, 1993.

CASEY, T.; ZAKRZEWSKA, E. I.; MAPLE, R. L.; LINTAULT, L.; WADE, C. E.; BAER, L. A.; RONCA, A. E.; PLAUT, K. Hypergravity disruption of homeorhetic adaptations to lactation in rat dams include changes in circadian clocks. **Biology Open**, v.1, n. 6, p. 570-81, 2012.

CLARK, T. K.; NEWMAN, M. C.; OMAN, C. M.; MERFELD, D. M.; YOUNG, L. R. Modeling human perception of orientation in altered gravity. **Frontiers in Systems Neuroscience**, 9:68.0, 2015.

COLON, L. T.; BUDDING, D. J.; KEIZER L. C. P.; PIETERS. M. M. J. Components of resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in eight South AmericanSolanum species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 101, n. 4, p. 441-456, 1995.

COLLINGS, D. A.; ZSUPPAN, G.; ALLEN, N. S.; BLANCAFLOR, E. B. Demonstration of prominent actin filaments in the root columella. **Planta.** v. 212, n. 3, p. 392-403. 2001

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. Genetics, v. 200(2), p. 387–407, 2015.

CROFTON, H. D. The vertical migration of infective larvae of strongyloid nematodes. **Journal of Helminthology**, v. 28, p. 35-52, 1954.

CROLL, N. A. Responses to gravity. In the Behaviour of Nematodes: Their Activity, Senses and Responses, pp. 72-77. London: Edward Arnold, 1970

DALIGCON, B. C.; OYAMA, J. Increased uptake and utilization of glucose by diaphragms of rats exposed to chronic centrifugation. **American Journal of Physiology**, v. 228, p. 42-46. 1975.

DEGUCHI, S., SHIMOSHIGE H.; TSUDOME, M.; MUKAI S.; CORKERY, R. W., ITO, S.; HORIKOSHI, K. Microbial growth at hyperaccelerations up to 403,627 x g. **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v. 108, p. 7997–8002, 2011.

DENVER, R. D.; DOLAN, P. C.; WILHELM, L. J.; SUNG, W.; J. LUCAS-LLEDÓ, I. HOWE, D. K.; LEWIS S. C.; OKAMOTO, K. THOMAS, K. W.; LYNCH, M.; BAERD, C. F. A genomewide view of Caenorhabditis elegans base-substitution mutation processes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States U. S. A.**, v.106, n. 38, p. 16310-4. 2009

DION, M.; BRUN, J. L. Cartographie génique du Nematode libre *Caenorhabditis elegans* Maupas 1900, variété Bergerac. I. Etude de deux mutants nains. **Molecular and General Genetics**, v. 112, p. 133–151, 1971.

DOUGHERTY, E.C. The genera of the subfamily Rhabditinae Micoletzky, 1922 (Nematoda). **Thapar Commemoration Volume**, p. 69-76, 1953.

EGAN, J. P.; CHEW, U. S.; KUO, C. H.; VILLARROEL-DIAZ, V.; HUNDT, P. J.; IWINSKI N. G.; HAMMER, M. P.; SIMONS, A. M. Diets and trophic guilds of small fishes from coastal marine habitats in western Taiwan. **Journal of fish biology,** v. 91, n. 1, p. 331-34, 2017. ERKUT, C.; PENKOV, S.; KHESBAK, H.; VORKEL, D.; VERBAVATZ, J. M.; FAHMY, K.; KURZCHALIA, T. V. Trehalose renders the dauer larva of *Caenorhabditis elegans* resistant to extreme desiccation. **Current Biolology**, v. 21, n. 15, p. 1331-6, 2011.

FAHIE, W. C.; BROWN, R. H. J. The Beams Ultracentrifuge. Nature, v. 138, p. 207-207, 1936.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, SE.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FRANCESCHINI, A.; SZKLARCZYK, D.; FRANKILD, S.; KUHN, M.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; LIN, J.; MINGUEZ, P.; BORK, P.; VON MERING, C.; JENSEN, L. J. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic Acids Research**, 41:D808-15, 2013.

FRANCESCHINI A, LIN J, VON MERING C, JENSEN LJ. SVD-phy: improved prediction of protein functional associations through singular value decomposition of phylogenetic profiles. **Bioinformatics**, btv696, 2015.

FRUMKIN, A.; DROR, S.; POKRZYWA, W.; BAR-LAVAN, Y.; KARADY, I.; HOPPE, T.; BEN-ZVI, A. Challenging muscle homeostasis uncovers novel chaperone interactions in *Caenorhabditis elegans*. Frontiers in Molecular Bioscience, v. 1, n. 21, 2014.

FUKAKI, H.; FUJISAWA, H.; TASAKA, M. SGR1, SGR2, SGR3: novel genetic loci involved in shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 110, n. 3, p. 945-55, 1996.

GAO, Z.; LIC, D.; MENGA, C.; XU, D.; ZHANG, X.; YE, N. Survival and proliferation characteristics of the microalga *Chlamydomonas sp.* ICE-L after hypergravitational stress pretreatment. **Icarus**, v. 226, n. 1, p. 971–979, 2013.

GAO Y., ZHANG Y.; ZHANG D.; DAI, X.; ESTELLE, M.; ZHAO, Y. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or Arabidopsis development. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 112, n.7, p. 2275–2280, 2015.

GLEESON, L.; SQUIRES, S.; BISGROVE, S. R. The microtubule associated protein END BINDING 1 represses root responses to mechanical cues. **Plant Science**, v. 187, p. 1-9, 2012.

GOLDEN, J.W.; RIDDLE, D.L. A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science, v. 218, p. 578-580, 1982.

GRAY, G. W. The Ultracentrifuge. Scientific American, v. 184, n.6, p. 42-51, 1951.

GUAN, C.; ROSEN E. S.; BOONSIRICHAI, K.; POFF, K. L.; MASSON, P. H. The ARG1-LIKE2 gene of Arabidopsis functions in a gravity signal transduction pathway that is genetically distinct from the PGM pathway. **Plant physiology**, v. 133, n. 1, p. 100-12, 2003.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **Electrophoresis**, v. 30, n. S1, S162-S173, 2009.

GUISBERT, E.; CZYZ, D. M.; RICHTER, K.; MCMULLEN, P. D.; MORIMOTO, R. I. Identification of a Tissue-Selective Heat Shock Response Regulatory Network. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 4, e1003466, 2013.

GUPPY M, WITHERS P. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 74, n. 1, p. 1-40, 1999.

HALLIDAY. D.; RESNICK, R.; WALKER J. "Vectors" In Fundamentals of Physics. Ed. John Wiley & Sons. Inc. NY. USA, v. 3. p. 97–130, 1993.

HAMILTON, M. B. Population Genetics. Hoboken: WILEY-BLACKWELL, p. 422, 2009.

HART, A. C., ed. Behavior WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.87.1, <u>http://www.wormbook.org</u>., 2006

HARRISON, B. R.; MASSON, P. H. ARG1 and ARL2 form an actin-based gravity-signaling chaperone complex in root statocytes? **Plant Signal Behaviour**, v. 3, n. 9, p. 650-3, 2008a.

HARRISON, B. R.; MASSON, P. H. ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, v. 53, n. 2, p. 380-92, 2008b.

HARVEY, E. B., Effects of centrifugal force on fertilized eggs of Arbacia punctulata as observed with centrifuge-microscope. **Biological Bulletin**, v. 65; n. 389, 1933a.

HARVEY, E. B., Development of the parts of the sea urchin eggs separated by centrifugal force. **Biological Bulletin**, v. 64, n.125, 1933b.

HENGARTNER, M. O.; HORVITZ, H. R. Programmed cell death in Caenorhabditis elegans. Current Opinion in Genetics & Development, v. 4, n. 4, p. 581–586, 1994.

HENGHERR, S.; WORLAND, M. R.; REUNER, A.; BRÜMMER, F.; SCHILL, R. O. Hightemperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 82, p. 749-755, 2009.

HERMAN, R. K. Touch sensation in Caenorhabditis elegans. Bioessay, v. 18, p. 196-206, 1996

HILL, R. J.; LARKIN, O. J.; DIJKSTRA, C. E.; MANZANO, A. I.; DE JUAN, E.; DAVEY, M. R.; ANTHONY, P.; EAVES, L.; MEDINA, F. J.; MARCO, R.; HERRANZ, R. Effect of magnetically simulated zero-gravity and enhanced gravity on the walk of the common fruitfly. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 9, 72, p. 1438-49, 2012.

HIRASAKA, K.; NIKAWA, T.; ASANOMA, Y.; FUROCHI, H.; ONISHI, Y.; OGAWA, T.; SUZUE, N.; OARADA, M.; SHIMAZU, T.; KISHI, K. Short-term hypergravity does not affect protein-ubiquitination and proliferation in rat L6 myoblastic cells. **Biological Sciences in Space**, v. 19, n. 1, p. 3-7, 2005.

HONDA, Y.; HIGASHIBATA, A.; MATSUNAGA, Y.; YONEZAWA, Y.; KAWANO, T.; HIGASHITANI, A.; KURIYAMA, K.; SHIMAZU, T.; TANAKA, M.; SZEWCZYK, N. J.; ISHIOKA, N.; HONDA, S. Genes down-regulated in spaceflight are involved in the control of longevity in *Caenorhabditis elegans*. Science Reports, vol. 2, n. 487, 2012.

HORIKAWA, D. D.; IWATA, K.; KAWAI, K.; KOSEKI, S.; OKUDA, T.; YAMAMOTO, K. High hydrostatic pressure tolerance of four different anhydrobiotic animal species. **Zoological Science**, v. 26, p. 238-242, 2009.

HOYEROVÁ, K.; PERRY, L.; HAND, P.; LANKOVÁ, M.; KOCÁBEK, T.; MAY, S.; KOTTOVÁ, J.; PACES, J.; NAPIER, R.; ZAZÍMALOVÁ, E. Functional characterization of PaLAX1, a putative auxin permease, in heterologous plant systems. **Plant Physiology**, v.146, n. 3, p. 1128-41, 2008.

JAMES, C. E.; DAVEY, M. W. A rapid colorimetric assay for the quantitation of the viability of free-living larvae of nematodes in vitro. **Parasitology Research**, v. 101, n. 4, p. 975-80, 2007.

JENSEN, L. J.; KUHN, M.; STARK, M.; CHAFFRON, S.; CREEVEY, C.; MULLER, J.; DOERKS, T.; JULIEN, P.; ROTH, A.; SIMONOVIC, M.; BORK, P.; VON MERING C. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms.

JÖNSSON KI, RABBOW E, SCHILL RO. HARMS-RINGDAHL, M., RETTBERG, P. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. **Current Biology**, v. 18, p. 729-731, 2008.

JOHNSON, T. E.; NELSON, G. A. *Caenorhabditis elegans*: a model system for space biology studies. **Experimental Gerontology**, v. 26, n. 2-3, p. 299-309, 1991.

KADAM, U.; MOELLER, C. A.; IRUDAYARAJ, J.; SCHULZ, B. Effect of T-DNA insertions on mRNA transcript copy numbers *upstream* and *downstream* of the insertion site in Arabidopsis thaliana explored by surface enhanced Raman spectroscopy. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 5, p. 568-77, 2014.

KALICHAMY, S. S.; LEE, T. Y.; YOON, K. H.; LEE, J. I. Hypergravity hinders axonal development of motor neurons in *Caenorhabditis elegans*. **PeerJ**, 4: e2666, 2016.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L. A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. Journal of Molecular Biology, v. 338, n. 5, p. 1027-1036, 2004.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E L. L. An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information **Bioinformatics**, v. 21 n. 1, p. 251-257, 2005.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E L. L Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. **Nucleic Acids Research**., v. 35, p. 429-32, 2007.

KATO, T.; MORITA, M. T.; TASAKA, M. Role of endodermal cell vacuoles in shoot gravitropism. Journal of Plant Growth Regulation, v. 21, n. 2, p. 113-9, 2002.

KIEFER, F.; ARNOLD, K.; KÜNZLI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**. v. 37, D387-D392, 2009.

KIM, N.; DEMPSEY, C. M.; KUAN, C. J.; ZOVAL, J. V.; O'ROURKE, E.; RUVKUN, G.; MADOU, M. J.; SZE, J. Y. Gravity force transduced by the MEC-4/MEC-10 DEG/ENaC channel modulates DAF-16/FoxO activity in *Caenorhabditis elegans*. Genetics. v. 177, n. 2, p. 835-45, 2007.

KIM, Y. J.; CHUNG, J. S.; JANG, T. Y.; KIM, Y. H.; CHIN, H. S. Hypergravity Effects on the Retina and Intraocular Pressure in Mice. Aerospace Medicine and Human Performance, v. 87, n. 1, p. 13-7, 2016.

KIMURA, M. The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. Japanese journal of genetics Idengaku Zasshi, v. 66, n. 4, p. 367-86, 1991.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell-walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanography and Marine Biology**, v. 26, p. 259–315, 1988

KOPP, J.; SCHWEDE T. The SWISS-MODEL Repository: new features and functionalities. **Nucleic Acids Research**, v. 34, D315-D318, 2006.

KOZEKO, L.; KORDYUM, E. Effect of Hypergravity on the Level of Heat Shock Proteins 70 and 90 in Pea Seedlings. **Microgravity Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 175-178, 2009.

KUMAR S., STECHER G., AND TAMURA K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, 33:1870-1874.

KWON, S. T.; OONO, K. Gravity responsible protein and mRNA related to the survival of rice (*Orysa sativa L.*) from gravity stress. **The Japanese Journal of Genetics**, v. 67, n. 4, p. 321-334, 1992.

LE BAIL, A.; BILLOUD, B.; KOWALCZYK, N.; KOWALCZYK, M.; GICQUEL, M.; LE PANSE, S.; STEWART, S.; SCORNET, D.; COCK, J. M.; LJUNG, K.; CHARRIER, B. Auxin metabolism and function in the multicellular brown alga Ectocarpus siliculosus. **Plant Physiology**, v. 153, n. 1, p. 128-44, 2010.

LE BOURG, E. A review of the effects of microgravity and of hypergravity on aging and longevity. Exp. Gerontol. 34: 319–336, 1999.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

LI, W.; COWLEY, A.; ULUDAG, M.; GUR, T.; MCWILLIAM, H.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; LOPEZ, R. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic Acids Research**, 43 (W1): W580-4, 2015.

LIU, J.; ZHENG, Q.; DENG, Y.; CHENG, C. S.; KALLENBACH, N. R.; LU, M. "A seven-helix coiled coil". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 42, p. 15457–62, 2006.

LUESSE, D. R.; SCHENCK, C. A.; BERNER, B. K.; JUSTUS, B.; WYATT, S. E. Gps4 is allelic to arl2: implications for gravitropic signal transduction. **Gravitational and Space Biology**, v. 23, n. 2, p. 95- 96, 2010.

LUPAS, A.; VAN DYKE, M.; STOCK, J. Predicting Coiled Coils from Protein Sequences, Science, v. 252, p. 1162-1164, 1991.

LUSCHNIG C, GAXIOLA RA, GRISAFI P, FINK GR. EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. Genes & Development, v. 12, n. 14, p. 2175-87, 1998.

LYON, E. P. Results of centrifugalizing eggs. Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen, v. 23, 1, p 151-173, 1907.

MACHO, L., R.; KVETNANSKY, M.; FICKOVA, I. A; POPOVA AND A.; GRIGORIEV, Effects of exposure to space flight on endocrine regulations in experimental animals. **Endocrine Regulations**, v. 35, p. 101–114, 2001.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-81, 2012.

MAI, Y. X.; WANG, L.; YANG, H. Q. A gain-of-function mutation in IAA7/AXR2 confers late flowering under short-day light in Arabidopsis. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, n. 6, p. 480-92, 2011.

MARCHLER-BAUER, A.; BO, Y.; HAN, L.; HE, J.; LANCZYCKI, C. J.; LU, S.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; WANG, Z.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; GEER, L. Y.; BRYANT, S. H. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Research**, 4;45, 2017.

MAUPAS, ÉMILE. La mue et l'enkystement chez les nématodes. Archives de Zoologie Expérimentale et Générale, v. 7, p. 563-628, 1899.

MAUPAS, É. Modes et formes de reproduction des nematodes. Archives de Zoologie Expérimentale et Générale, v. 8, p. 463–624, 1900 Retrieved 2009-05-27.

MCWILLIAM H, LI W, ULUDAG M, SQUIZZATO S, PARK YM, BUSO N, COWLEY AP, LOPEZ R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, 41, W597-600, 2013.

MELOSH, H. Blasting rocks off planets. Nature, v. 363, p. 498–499, 1993.

MOERMAN, D. G.; PLURAD, S.; WATERSTON, R. H.; BAILLIE, D. L. Mutations in the unc-54 myosin heavy chain gene of *Caenorhabditis elegans* that alter contractility but not muscle structure. **Cell**, v. 29, n. 3, p. 773-81, 1982.

MORGAN, T. H. Cytological studies of centrifuged eggs. **Journal of Experimental Zoology**, v. 9, n. 3, p. 593–655, 1910.

MOREY-HOLTON, E. R. Gravity, in *Evolution on Planet Earth*, edited by L. Rothschild and A. Lister. Academic Press, London, pp. 143–183, 2003.

MULLEN, J. L.; TURK, E.; JOHNSON, K.; WOLVERTON, C.; ISHIKAWA, H.; SIMMONS, C.; SÖLL, D.; EVANS, M. L. Root-growth behavior of the Arabidopsis mutant rgr1. Roles of gravitropism and circumnutation in the waving/coiling phenomenon. **Plant Physiology**, v. 118, n. 4, p. 1139-45, 1998.

MUSCHIOL, D.; SCHROEDER, F.; TRAUNSPURGER, W. Life cycle and population growth rate of Caenorhabditis elegans studied by a new method. **BMC Ecology**, 9: 14, 2009.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, v. 3, p. 418-426, 1986.

NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York, 2000.

NICHOLLS, H. Stopping the Rot. Plos Biology, 2(7): e213, 2004.

NIGON, V. M.; FÉLIX, M. A. History of research on C. elegans and other free-living nematodes as model organisms. **WormBook**, p. 1-91, 2017.

ONODERA, A.; YANASE, S.; ISHII, T.; YASUDA, K.; MIYAZAWA, M.; HARTMAN, P. S.; ISHII, N. Post-dauer life span of *Caenorhabditis elegans* dauer larvae can be modified by X-irradiation. Journal of Radiation Research, v. 51, n. 1, p. 67-71, 2010.

OKUMURA, E; TANAKA, R.; YOSHIGA, T. Negative gravitactic behavior of *Caenorhabditis japonica* dauer larvae. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n.8, p.1470-4, 2013.

OSCHE, G. Systematik und Phylogenie der Gattung Rhabditis (Nematoda). Zoologische Jahrbücher (Systematik), v. 81, p. 190-280, 1952.

PARK, J. O.; EL-TARABILY, K. A.; GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Pathogenesis of Streptoverticillium albireticuli on Caenorhabditis elegans and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. Letters in Applied Microbiology, v. 35, n. 5, p. 361-5, 2002.

PETERS, B. G. Toxicity tests with vinegar eelworm. I. Counting and culturing. Journal of Helminthology, v. 26, p. 97-110, 1952.

PERRIN, R. M.; YOUNG, L.; NARAYANA M. U. M.; HARRISON, B. R.; WANG, Y.; WILL, J. L.; MASSON, P. H. (2017-04-21). "Gravity Signal Transduction in Primary Roots". Annals of Botany. v. 96, n. 5, p. 737–743, 2005.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** v. 9, n. 900, p. 2002-2007, 2001.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D, et al., editors. The Otolith Organs: The Utricle and Sacculus In: Titulo do livro: Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2001.

GUERMEUR, Y.; GEOURJON, C.; GALLINARI, P.; DELÉAGE, G. Improved performance in protein secondary structure prediction by inhomogeneous score combination. **Bioinformatics** v. 15 n. 5, p. 413-421, 1999.

QIAO, L.; LUO, S.; LIU, Y.; LI, X.; WANG, G.; HUANG, Z. Reproductive and locomotory capacities of *Caenorhabditis elegans* were not affected by simulated variable gravities and spaceflight during the Shenzhou-8 mission. **Astrobiology**, v. 13, n. 7, p. 617-25, 2013.

QIU, X. B.; SHAO, Y. M.; MIAO, S.; WANG, L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. **Cellular and molecular life science**, v. 63, n. 22, p. 2560-70, 2006.

RAIZEN, D.M.; ZIMMERMAN, J. E.; MAYCOCK, M. H.; TA, U. D.; YOU, Y. J.; SUNDARAM, M. V.; PACK, A. I. Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. **Nature**, v. 451, n. 7178, p. 569-72, 2008.

RAMPELOTTO, P. H. Extremophiles and Extreme Environments. Life (Basel). v. 3, n.3, p. 482–485, 2013.

ROMIGUIER, J.; ROUX, C. Analytical Biases Associated with GC-Content in Molecular Evolution. Frontiers in Genetics, v.8, n. 16, 2017.

RUSSOMANO T, RIZZATTI MR, COELHO RP, SCOLARI D, DE SOUZA D, PRÁ-VELEDA P. Effects of simulated hypergravity on biomedical experiments. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 26, n. 3, p. 66-71, 2007.

SALDANHA, J. N.; PANDEY, S.; POWELL-COFFMANA, J. A. The effects of short-term hypergravity on *Caenorhabditis elegans*. Life Sciences in Space Research, v. 10, p. 38–46, 2016.

SASAGAWA, Y.; SAITO, Y.; SHIMIZU, M.; TAKAHASHI, H.; ISHIOKA, N.; FUKUI, K.; YAMASHITA, M.; HIGASHITANI, A. Effects of gravity on early embryogenesis [correction of embryogenesis] in *Caenorhabditis elegans*. **Biological Sciences in Space Journal**, v. 17, n. 3, p. 217-8, 2003.

SILADY, R. A.; KATO, T.; LUKOWITZ, W.; SIEBER, P.; TASAKA, M.; SOMERVILLE, C. R. The gravitropism defective 2 Mutants of Arabidopsis Are Deficient in a Protein Implicated in Endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. **Plant Physiology**, v. 136, n. 2, p. 3095–3103, 2004.

SILADY, R. A.; EHRHARDT, D. W.; JACKSON, K.; FAULKNER, C.; OPARKA, K.; SOMERVILLE, C. R. The GRV2/RME-8 protein of Arabidopsis functions in the late endocytic pathway and is required for vacuolar membrane flow. **The Plant Journal**, v. 53, n 1, p. 29-41, 2008.

SWARUP, R.; KRAMER, E. M.; PERRY, P.; KNOX, K.; LEYSER, H. M. O.; HASELOFF, J.; BEEMSTER, G. T. S.; BHALERAO, R.; BENNETT, M. J. (2005-11-01). "Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal". **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 1057–1065, 2005.

SEDBROOK, J.; BOONSIRICHAI, K.; CHEN, R.; HILSON, P.; PEARLMAN, R.; ROSEN, E.; RUTHERFORD R, BATIZA A, CARROLL K, SCHULZ T, MASSON PH. Molecular genetics of root gravitropism and waving in *Arabidopsis thaliana*. Gravitational and Space Biology Bulletin, v.11, n. 2, p. 71-8, 1998.

SEDBROOK, J. C.; CHEN, R.; MASSON, P. H. ARG1 (altered response to gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton. **Proceedings of the National** Academy of Sciences of the United States of America (USA), v. 96, p. 1140–1145, 1999.

SHEN, Y.; JI, G.; HAAS, B. J.; WU, X.; ZHENG, J.; REESE, G. J.; LI Q. Q. Genome level analysis of rice mRNA 3'-end processing signals and alternative polyadenylation. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 9, p. 3150–3161, 2008.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, 7:539, 2011.

SNEL, B.; LEHMANN, G.; BORK, P.; HUYNEN, M. A. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. **Nucleic Acids Research**, 28(18):3442-4, 2000.

SOGA, K., K. WAKABAYASHI, S. KAMISAKA AND T. HOSON. Mechanoreceptors rather than sedimentable amyloplasts perceive the gravity signal in hypergravity-induced inhibition of root growth in azuki bean. **Functional Plant Biology**, v.32, p. 175–179, 2005.

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

SUNG, W.; TUCKER, A. E.; DOAK, T. G.; CHOI, E.; THOMAS, W. K.; LYNCH, M. Extraordinary genome stability in the ciliate Paramecium tetraurelia. **Proceedings of the National** Academy of Sciences U S A, v. 109, n. 47, p. 19339-44, 2012.

STREET, I. H.; MATHEWS, D. E.; YAMBURKENKO, M. V.; SOROOSHZADEH, A.; JOHN, R. T.; SWARUP, R.; BENNETT, M. J.; KIEBER, J. J.; SCHALLER, G. E. Cytokinin acts through the auxin influx carrier AUX1 to regulate cell elongation in the root. **Development**, v. 143, n. 21, p. 3982-3993, 2016.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; KUHN, M.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; MINGUEZ, P.; DOERKS, T.; STARK, M.; MULLER, J.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. **Nucleic Acids Research**, 39:D561-8, 2011.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTA-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, K. P.; KUHN, M.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, 43:D447-52, 2015.

SZKLARCZYK, D.; MORRIS, J. H.; COOK, H.; KUHN, M.; WYDER, S.; SIMONOVIC, M.; SANTOS, A.; DONCHEVA, N. T.; ROTH, A.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, 45:D362-68, 2017.

TAJIMA F. (1989). Statistical method to test for nucleotide mutations hypothesis by DNA polymorphism. Genetics, v. 123, p. 585-595.

TAMAOKI, D.; KARAHARA, I.; NISHIUCHI, T.; WAKASUGI, T.; YAMADA, K.; KAMISAKA, S. Effects of hypergravity stimulus on global gene expression during reproductive growth in Arabidopsis. **Plant Biology**, v.16, n. 1, p.179-86, 2014.

TAMURA K. AND NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.

TANG, H.; CHEN, L.; LIU, J.; SHI, J.; LI, Q.; WANG, T.; WU, L.; ZHAN, F.; BIAN, P. Radioadaptive Response for Reproductive Cell Death Demonstrated in In Vivo Tissue Model of *Caenorhabditis elegans*. **Radiation Research**, v. 185, n. 4, p. 402-10, 2016.

TEMPLETON, A. R. Population Genetics and Microevolutionary Theory. St. Louis Missouri: John Wiley & Sons., Inc., Wiley-Lissp. p. 716, 2006.

TUNNACLIFFE, A.; LAPINSKI, J. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 358 n. 1438, p. 1755-1771, 2003.

TZEAN, S. S.; ESTEY, R. H. Species of Phytophthora and Pythium as Nematode-destroying Fungi. Journal of Nematology, v.13, n. 2, p. 160-3, 1981.

UJISAWA, T.; OHTA, A.; OKAHATA, M.; SONODA, S.; KUHARA, A. Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in *C. elegans*. **Protocol Exchange**, 2014.

VASANTHAN, T.; ALEJALDRE, L.; HIDER, J.; PATEL, S.; HUSAIN, N.; UMAPATHISIVAM, B.; STONE, J. G-Equivalent Acceleration Tolerance in the Eutardigrade Species *Hypsibius dujardini*. Astrobiology, v. 17, n. 1, p. 55-60, 2017.

VON MERING, C.; HUYNEN, M.; JAEGGI, D.; SCHMIDT, S.; BORK, P.; SNEL, B. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. **Nucleic Acids Research**, 31:258-61, 2003.

VON MERING, C.; JENSEN, L. J.; SNEL, B.; HOOPER, S. D.; KRUPP, M.; FOGLIERINI, M.; JOUFFRE, N.; HUYNEN, M. A.; BORK, P. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. **Nucleic Acids Research**, 33:D433-7, 2005.

VON MERING, C.; JENSEN, L. J.; KUHN, M.; CHAFFRON, S.; DOERKS, T.; KRUEGER, B.; SNEL, B.; BORK, P. STRING 7--recent developments in the integration and prediction of protein interactions. **Nucleic Acids Research**, 35: D358-62, 2007.

WALDRON, K. W.; BRETT C. T. Effects of Extreme Acceleration on the Germination, Growth and Cell Wall Composition of Pea Epicotyls. **Journal of Experimental Botany**, v. 41 n. 1, p. 71-77, 1990.

WANG, D. Y.; KUMAR, S.; HEDGES, S. B. Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. **Proceedings, Biological Sciences,** v. 266, n.1415, p. 163-71, 1999.

WARD, A.; LIU, J.; FENG, Z.; XU, X. Z. Light-sensitive neurons and channels mediate phototaxis in C. elegans. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 8, p. 916-22, 2008.

WINSTON, W. M.; MOLODOWITCH, C.; HUNTER, C. P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. **Science**, v. 295, n. 5564, p. 2456-9, 2002.

YAMAUCHI, Y.; FUKAKI, H.; FUJISAWA, H.; TASAKA, M. Mutations in the SGR4, SGR5 and SGR6 loci of Arabidopsis thaliana alter the shoot gravitropism. **Plant & Cell Physiology**, v. 38, n. 5, p. 530-5, 1997.

ZALOKAR M. Cytochemistry of centrifuged hyphae of *Neurospora*. Experimental Cell Research, v. 19, p. 114-32, 1960.

ZDOBNOV, E. M.; VON MERING, C.; LETUNIC, I.; BORK, P. Consistency of genome-based methods in measuring Metazoan evolution. **FEBS Letters**, v. 579, n. 15, p. 3355-61, 2005.

ZHANG, J.; KUMAR, S.; & NEI, M. Small-sample tests of episodic adaptive evolution: a case study of primate lysozymes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 1335-1338, 1997

<u>8. APÊNDICES</u>

### 8.1. APÊNDICE I

Artigo publicado pelo nosso grupo no periódico "Invertebrate Survival Journal" em 2017

ISJ 14: 85-93, 2017

ISSN 1824-307X

#### RESEARCH REPORT

# Survival potential of the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus* submitted to extreme abiotic stresses

TAJ de Souza<sup>1</sup>, GJ de Carli<sup>1</sup>, TC Pereira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, FMRP, University of São Paulo, Brazil <sup>2</sup>Department of Biology, FFCLRP, University of São Paulo, Brazil

Accepted March 28, 2017

#### Abstract

Most organisms die when confronting extreme desiccation regimes, as observed in severe and prolonged droughts. However, some organisms are able to withstand such conditions by entering into a unique state of true suspended animation known as anhydrobiosis. Notably, anhydrobiosis also renders the organism tolerant to several other physical stresses such as extremes of temperature, pressure and radiation. Anhydrobiosis-based technologies are promising strategies to preserve crop plants as well as organs for transplant. In order to understand the relation between anhydrobiosis and tolerance to physical stresses, we submitted the anhydrobiosis (desiccated). Remarkably, our data revealed that hydrated *P. superbus* naturally displays considerable tolerance to ultra-low temperature (-196 °C), X-radiation (500 Gy) and ultracentrifugation (400,000xg) in the tested conditions. More importantly, anhydrobiosis enhances nematode tolerance to ultra-low and high temperatures (+100 °C), but not to X-radiation or ultracentrifugation. These findings may help explain the successful wide distribution of *P. superbus* on Earth, since extremes of temperature are the most common stresses confronted by this species. Finally, due to its intrinsic survival potential (hydrated or desiccated), our data evidence the potential of *P. superbus* as a model in astrobiology.

Key Words: anhydrobiosis; desiccation tolerance; X-radiation; extreme temperatures; ultracentrifugation

*Corresponding author:* Tiago Campos Pereira Dpto de Biologia, FFCLRP Universidade de São Paulo - USP Av. Bandeirantes, 3900. Bairro Monte Alegre Ribeirão Preto - SP, Brasil. CEP 14040-901. E-mail: tiagocampospereira@ffclrp.usp.br

Introduction

The phenomenon of anhydrobiosis (from the Greek: "life without water") was first described over 300 years ago by Antonie van Leeuwenhoek and can be defined as a highly stable state of true suspended animation that ertain organisms (within diverse groups including bacteria, yeasts, plants and small invertebrates) enter when exposed to very low relative humidity conditions (Tunnacliffe and Lapinski, 2003). While most organisms die in this scenario, these organisms lose 95 - 99 % of the body water content, replacing their intracellular aqueous milieu by an amorphous bioglass, composed of trehalose (Erkut et al., 2011), intrinsically disordered proteins (Boothby et al., 2017) and other elements, which literally arrests all biomolecules in space and time. This ametabolic state is stable for long periods of time; life is resumed when the organism is rehydrated (Crowe et al., 1992, Clegg, 2001; Tunnacliffe and Lapinski, 2003; Rebecchi et al., 2007). Notably, several anhydrobiotic organisms (or anhydrobionts) are able to tolerate different types of stress when desiccated (e.g., ionizing radiation, vacuum, extreme temperatures, high hydrostatic pressures, hipogravity, etc) (Tunnacliffe and Lapinski, 2003; Hengherr et al., 2009; Horikawa et al., 2009; Jönsson et al., 2008; Beltrán-Pardo et al., 2013). Therefore, anhydrobiotic organisms are extremotolerant, i.e., they may live in conditions similar to those 'suitable for human life', but can tolerate conditions of extreme abiotic stress when necessary (Rampelotto, 2013). The phenomenon of anhydrobiosis displays an immense biotechnological potential in agriculture and biomedicine: the preservation of crops during severe droughts as well as organ preservation at room temperature for transplant. Recently, an anhydrobiosis-based strategy for vaccine storage at room temperature was developed (Alcock, 2010). illustrating the great potential behind this natural phenomenon.



Heat (survival)

**Fig. 1** Tolerance of dessicated *P. superbus* to heat. N = 600 per group, per technical replicate. Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05).

Panagrolaimus superbus is a free-living anhydrobiotic nematode of approximately 1 mm in length, dioic, which was first described by Fuchs (1930). Members of the genus *laimus* occupy several different niches, from Antarctic, volcanic islands, temperate and semi-arid soils to terrestrial mosses (Shannon *et al.*, 2005; Mcgill *et al.*, 2015). It is closely related to the well characterized nematode *Caenorhabditis elegans*. Here we investigated the tolerance profile of *P. superbus* to extremes of temperature (-196 °C and

+100 °C), X-radiation (100 and 500 Gy) and hypergravitational force (400,000xg) in order to uncover the survival potential of this species in the hydrated and desiccated (anhydrobiotic) states, as well as the role of anhydrobiosis on these abilities.

#### Material and Methods

#### Nematode maintenance

*Panagrolaimus superbus*, kindly provided by Prof. Tunnacliffe A (University of Cambridge, UK), was maintained in the dark, at 20 °C, on NGM (Nematode Growth Medium) agar plates and fed with a layer of *Escherichia coli* (OP50 strain). Mixed populations, composed of all developmental stages, were used in all experiments.

#### Desiccation, rehydration and viability assay

NGM agar plates were rinsed with M9 buffer in order to dislodge and collect worms, which were subsequently washed three times with M9 buffer to remove excess of bacteria. Worms were then immobilized on 0.45 µm Supor filter membranes by vacuum filtration using a Sartorius funnel. These membranes were placed in a sealed chamber containing a saturated solution of CuSO<sub>4</sub>, for 24 h [pre-conditioning in 98 % relative humidity (RH)]. Then, they were transferred to another chamber containing regenerated silica gel, for 24 h (desiccation in 10 % RH). Desiccated worms were then submitted to different stresses (temperature, Xradiation or ultracentrifugation), as described below. Thereafter, membranes were placed in a chamber with distilled water for 24 h (pre-rehydration in 100

% RH) and then the membranes are immersed in M9 buffer for 3 h for worm rehydration. Subsequently, we performed a survival assay using a modified version of protocol which has been used for isolated cells (Krause *et al.*, 1984). Briefly, the supernatant was removed and erythrosin B dye was added (0.4 % w/v in M9 buffer). After 1 h, samples were washed three times with M9 buffer to remove excess of dye. Dead worms stained in pink, live worms remained unstained.

#### Liquid Nitrogen (-196 °C)

The exposure procedure to liquid nitrogen (N<sub>2</sub>) was based on previous experiments performed in tardigrades with some modifications (Horikawa *et al.*, 2008). After 24 h in regenerated silica gel chamber, desiccated worms (immobilized on Supor membranes and placed inside closed 1.5 ml microtubes without paraffin) were immersed for 15 min, 30 min, 1 h, 1 week or 1 month directly in liquid N<sub>2</sub> (-196 °C). At the end of exposure, worms were thawed at room temperature for 5 min and submitted to the subsequent steps (prerehydration, rehydration and viability assay). Negative control group (NC) was composed of hydrated worms immobilized on membranes, placed inside microtubes and directly immersed in liquid N2. Positive control group (PC) was composed of desiccated worms immobilized on membranes, placed inside microtubes but not immersed in liquid N2. Experimental group (EG) was composed of desiccated worms immobilized on membranes, placed inside microtubes and directly immersed in liquid N2. Three biological replicates were performed (N = 600 per group, per technical replicate. Each technical replicate comprised all three groups: NC, PC and EG. The only exceptions were PC for 15 min, 30 min and 1 h, which are the same, since they are functionally equivalent). Statistical analyses (One Way ANOVA) were performed for each time point (comparing the corresponding PC, NC and EG).

#### Heat (50 - 100 °C)

Desiccated worms (immobilized on Supor membranes and placed in 0.6 mL microtubes) were subjected to heating at different temperatures (50

°C, 62.5 °C, 75 °C, 78 °C, 81 °C, 87.5 °C or 100 °C)

using a thermal cycler (mastercycle Eppendorf). Treatment of samples started at 25 °C with an increase rate of 5 °C every 2 min until reaching the desired temperature (previously indicated), in which they remained for 5 min. This period of time (5 min) was chosen since it may represent acute 'peaks of stress' that occur in nature. Since survival percentage of desiccated worms at 50 °C is high, we assume that temperatures below it may not represent stressing conditions. In a second experiment, worms were exposed to 50 °C for 15 min, 30 min or 1 h. NC was composed of hydrated worms immobilized on membranes and exposed to heating. PC was composed of desiccated worms immobilized on membranes but not exposed to heating. EG was composed of desiccated worms immobilized on membranes and exposed to heating. Three biological replicates were performed (N = 600 per group, per technical replicate. Each technical replicate comprised all three groups: NC, PC and EG). Statistical analyses (One Way ANOVA) were performed comparing all groups (Fig. 1) or within each group separately (NC or EG) (Fig. 2).

#### X-Radiation

In order to measure the tolerance of *P. superbus* to Xradiation, desiccated worms were immobilized on membranes and placed in Petri dishes which were irradiated (100 or 500 Gy) using the RS 200 Biological Research irradiator (Rad Source) located in the radiology section of the University of São Paulo Hospital - FMRP/USP. After rehydration worms were divided into 10 equal samples and population sizes were determined throughout 10 time points (the following 10 days after stress). Population growth (in percentage) was determined by dividing the final number of living worms (output) by initial number of worms (input). NC was composed of hydrated worms immobilized on membranes and exposed to radiation. PC was composed of desiccated worms immobilized on



**Fig. 2** Tolerance of *P. superbus* to 50°C for different periods of time. Negative Control (NC): hydrated worms immobilized on membrane and exposed to stress; Experimental Group (EG): desiccated worms immobilized on membrane and exposed to stress. N = 600 per group, per technical replicate. Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05). #: marked groups are not statistically different.



**Fig. 3** Tolerance of *P. superbus* to X-radiation. PC (Positive Control): desiccated worms immobilized on membranes but not exposed to stress; NC\* (Negative Control\*): hydrated worms immobilized on membranes but not exposed to stress; NC 100 Gy (or 500 Gy) (Negative Controls): hydrated worms immobilized on membranes and exposed to 100 Gy (or 500 Gy); EG 100 Gy (or 500 Gy) (Experimental Groups): desiccated worms immobilized on membranes and exposed to 100 Gy (or 500 Gy). N = input of 100 per group, per day, per technical replicate. Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05). #: marked groups are not statistically different.

membranes but not exposed to radiation. EG was composed of desiccated worms immobilized on membranes and exposed to radiation. An additional negative control group (NC\*) consisting of immobilized hydrated worms not exposed to radiation was used in order to reproduce 'population dynamics' close to which is observed under normal conditions. Three biological replicates were performed (N = 1,000 per group, per technical replicate. Each technical replicate comprised all three groups: NC, PC and EG). Statistical analyses (One Way ANOVA) were performed comparing only the groups within the same time point (Figs 3, 4).

#### Ultracentrifugation (hypergravitational force)

*P. superbus* worms were centrifuged at 400,000×g at 4 °C (the working temperature of the equipment) for 5, 15, 30 min or 1 h using MAX-XP Ultracentrifuge. Desiccated immobilized worms, submitted to centrifugation were considered as the EG. Hydrated immobilized worms, submitted to centrifugation were considered as the NC. Non- immobilized worms centrifuged while immersed in M9 buffer were considered as 'M9 negative control' (M9-NC). Hydrated, non-immobilized worms, not centrifuged but kept at 4 °C for 1 h were considered as the 'PC4 °C'. Two positive controls were used. Positive control 1 (PC1): desiccated, immobilized worms, kept at 4 °C for 1 h but not centrifuged and then rehydrated. Positive control 2 (PC2): non- immobilized worms kept in M9 at 4 °C for 1 h but not centrifuged. Three biological replicates were performed, each one consisting of three technical replicates (each one comprising all three groups: NC, PC and EG). N = 600 worms/technical replicate. Statistical analyses (One Way ANOVA) were performed comparing only the groups within the same time point (Fig. 5).

#### Statistical analyses

All experiments were performed in biological triplicates (each one consisting of technical triplicates) and data are presented as mean values and standard deviations. Statistical analyses were performed using "One Way ANOVA" (with Student Newman post-hoc or Student-Newman-Keuls for ultracentrifugation). Statistical differences were considered significant when  $p \le 0.05$ . Identical letters indicate those groups are not statistically different. Distinct letters indicate those groups are statistically different. In some cases, one group may be statistically not different from only one specific group, within a larger set of groups indicated with a different letter. In these specific cases, those groups indicated with hashtag (#) are not statistically different.

#### Results

#### Tolerance to liquid nitrogen

Remarkably, a considerable percentage of hydrated *P. superbus* is tolerant to liquid nitrogen (196 °C) in the absence of any cryoprotectants for up to one month (22.6 % on the average of the five time points) (Fig. 6). Survival is 30.2 % after 15 min, decreasing to 9.8 % after four weeks submitted to ultracold conditions.

More importantly, desiccated worms exposed to liquid nitrogen always displayed much higher, statistically significant, survival percentages (80.9 % on the average of the five time points) than NC group - similar or higher than the PC group in all treatments (75.0 % on the average). Therefore, hydrated *P. superbus* presents a natural tolerance to ultra-low temperature (indicated as NC), which is enhanced by anhydrobiosis in the long term (indicated as EG).



**Fig. 4** Population growth of *P. superbus* exposed to X-radiation. PC (Positive Control): desiccated worms immobilized on membranes but not exposed to stress; NC\* (Negative Control\*): hydrated worms immobilized on membranes but not exposed to stress; NC 100 Gy (or 500 Gy) (Negative Controls): hydrated worms immobilized on membranes and exposed to 100 Gy (or 500 Gy); EG 100 Gy (or 500 Gy) (Experimental Groups): desiccated worms immobilized on membranes and exposed to 100 Gy (or 500 Gy). N = input of 100 per group, per day, per technical replicate. Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05).

#### Tolerance to heating (50 °C - 100 °C)

The survival curve (Fig. 1) evidenced that desiccation rendered worms tolerant to heating. Viability percentages obtained after exposure to temperature gradient revealed a nearly linear, inverse correlation, with a significant decrease observed from 75 °C above. This data also evidences that a small fraction of the desiccated population seems to be thermostable from 80 °C to

100  $^{\rm o}{\rm C}$  (7.5 % on the average of the three time points). As expected, worms in almost all NC (hydrated exposed

to heating) died (data not shown). Therefore, by comparing both groups (hydrated versus desiccated), our data evidences that anhydrobiosis confers partial heat tolerance.

Although high temperatures are lethal to hydrated *P. superbus*, a few worms were still alive at 50 °C for 15 min (6.5 %; Fig. 2, NC), a situation abolished by 1 h. Remarkably, a high percentage (74.3 %) of desiccated worms remained viable after one hour at 50 °C, evidencing a protective effect of anhydrobiosis to heat. However, this tolerance gradually diminishes.

#### X-Radiation

Viability analysis of irradiated worms throughout ten days revealed small but statistically significant decreases on the first, second and sixth days (differences observed among groups within the same day), especially in desiccated worms exposed to 500 Gy (Fig. 3). Therefore, according to these experiments, X-ray doses of 100 and 500 Gy were not lethal to worms within the period of analysis.

Conversely, analysis of population growth indicated an apparent negative effect of X-rays from the seventh day on, which is statistically significant at day ten. During this period, both hydrated and desiccated worms exposed to 500 Gy presented stagnation of population growth (Fig. 4) (on average both groups - NC 500 Gy and EG 500 Gy - halted at

103.9 % at day ten, compared to the average of

1,162.6 % of the other groups).

Therefore, our data evidence that anhydrobiosis does not confer tolerance against X-radiation in any tested condition, since there were no differences in survival or population growth between experimental groups and their respective NCs.

#### Ultracentrifugation

Experiments with hypergravitational forces revealed unexpected findings (Fig. 5). Notably, a high percentage (41.3 %) of desiccated *P. superbus* is tolerant to extreme hyperacceleration (400,000xg) for 1h. However, more surprisingly is the fact that hydrated worms (immobilized on filter membranes) presented a similar result (39.1 %), thus uncovering a natural tolerance of this nematode to extreme *g*- forces. Since the filter membrane, used as immobilization

substrate for both previous groups, often collapsed during ultracentrifugation (potentially damaging the worms), we decided to evaluate non- immobilized *P*. *superbus*. Remarkably, such hydrated and freely swimming worms in liquid medium are virtually fully tolerant to such *g*-force (5 min - 96.7 %; 15 min - 97.2 %; 30 min 98.3; 1 h -

98.0 %) (Fig. 5).

#### Discussion

*P. superbus* is an anhydrobiotic nematode able to thrive at diverse enviromental conditions. Our data reveals that anhydrobiosis confers considerable resilience to high temperatures for short periods, a situation that might take place in natural environments as semi-dry soils (Shannon *et al.*, 2005). We also observed that *P. superbus* tolerates up to 1 h in a relatively high temperature (50 °C). Taken together, these data indicate that anhydrobiosis guarantees the perpetuation of the desiccated population when exposed to high temperatures for varying periods of time in natural environments.

Notoriously, *P. superbus* can be stored at -80 °C for 24 h without compromising viability (Mcgill *et* 

#### Ultracentrifugation (survival)



**Fig. 5** Tolerance of *P. superbus* to ultracentrifugation. N = 600 per group, per technical replicate. Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05). PC1: positive control group 1, desiccated worms immobilized on membranes but not centrifuged, kept at 4 °C for 1 h. PC2: positive control group 2, worms kept in M9 buffer but not centrifuged, kept at 4 °C for 1 h. NC: negative control group, hydrated, immobilized worms, centrifuged at 4 °C for 1 h. PC4 °C: hydrated, non-immobilized worms, not centrifuged but kept at 4 °C for 1 h. EG: experimental group, desiccated worms, immobilized on membranes, centrifuged at 4 °C for 1 h. M9-NC: hydrated worms immersed on M9 buffer, centrifuged at 4 °C for 1 h.

*al.*, 2015). When comparing survival of hydrated versus desiccated *P. superbus*, both submitted to ultralow or high temperatures, the second group displayed higher viability in both stressing scenarios. Therefore, acute tolerance of desiccated

*P. superbus* to extremes of temperature is due to anhydrobiosis rather than a natural adaptation of this species to extreme cold environments (a common habitat) or to heat (which in fact is lethal). The comprehension, at the genetic, biochemical and physiological levels, of how anhydrobiosis renders the organism tolerant to -196 °C for such long periods or to high temperatures may not only help the advancement of cryobiology and anhydrobiotic engineering, but also to understand the limits of life confronting physical stresses.

When comparing survival percentages of desiccated worms to ultralow versus high temperatures, it is clear that anhydrobiosis confers higher tolerance for long periods at ultralow temperatures rather than at high This may seem counterintuitive ones. since anhydrobiosis is a phenomenon directly related to high temperatures (when dehydration/desiccation naturally place). This lower tolerance to higher takes temperatures is probably due to the transition point of the bioglass, an amorphous matrix composed in some species of non-reducing disaccharides and other proteins which seems to stabilize the structure and cellular constituents during anhydrobiosis (Buitink et al., 2004; Sakurai et al., 2008; Hengherr et al., 2011). If the external temperature raises up to values above the glass-transition point, its own integrity is compromised, thus decreasing viability (Hengherr et al., 2009).

Curiously, different anhydrobiotic organisms seem to present distinct glass-transition points (or other heatstabilizing elements), as judged by the fact that they tolerate higher temperatures. These are the cases of some rotifers, tardigrades and nematodes which survive to brief exposure to +150

<sup>o</sup>C (reviewed in Tunnacliffe and Lapinski, 2003; Eisenback *et al.*, 2013).

Radiation exposure is possibly the most studied stress in suspended animation in scientific literature (Horikawa *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2006; Gladyshev and Meselson, 2008; Nilsson *et al.*, 2010; Beltrán-Pardo, 2013, 2015). These studies have focused on the understanding of eukaryote's resilience to ionizing radiations and can be compared to other radiation analyses in non- anhydrobiotic animal models such *Drosophila melanogaster*. As previously observed in *C. elegans* (Onodera *et al*, 2010), doses of 100 and 500 Gy caused no viability decrease in *P. superbus* ten days after exposure to X-rays, probably due to eutely (low degree of somatic cell divisions in the adults), thus less susceptible to the harmful effects of radiation.

However, the stagnation in population growth at 500 Gy dose possibly reveals a sterilizing (Chang *et al.*, 2015) or egg-lethality effect of X-rays. More importantly, our data evidence that anhydrobiosis does not confer tolerance against X-radiation in any tested condition. Other anhydrobiotic organisms, when exposed to intense radiation regimes, suffer extensive DNA damage. However, they survive by activating unique DNA repair systems, able to reconstruct all the genomic landscape (Zahradka *et al.*, 2006). Our data suggest that such mechanisms

Liquid nitrogen (survival)



**Fig. 6** Tolerance of *P. superbus* to liquid nitrogen. Positive Control (PC): desiccated worms immobilized on membrane but not exposed to stress; Negative Control (NC): hydrated worms immobilized on membrane and exposed to stress; Experimental Group (EG): desiccated worms immobilized on membrane and exposed to stress. N = 600 per group, per technical replicate. Statistical analyses were performed for each time point separately. Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05).

are not present in *P. superbus*, or if so, they are not effective within the tested conditions (period and dose). Deguchi *et al.* (2011) revealed that single-celled microorganisms are able to withstand (and even discretely thrive) when subjected to 400,000xg. Since this experimental condition seemed to be an interesting physical stress to test anhydrobiosis' protective effect in a multicellular organism, we submitted desiccated *P. superbus* to ultracentrifugation.

We initially hypothesized that such extreme forces would be lethal, to both hydrated and desiccated worms, leading to sedimentation of intracellular components, affecting internal structures and body morphology. However, unexpectedly, we observed that hydrated worms are completely tolerant to such extreme physical stress.

After a deep and extensive search in the literature we noted that Beams and King (1936) showed that eggs of the nematode *Ascaris suum* were able to withstand identical hypergravitational forces, presenting dividing cells 48 h later. The only other report is of Morey-Holton (2003), who mentioned in a review that *'nematodes tolerate 10<sup>5</sup>xg for brief periods'* (without reference), leading us to believe that it refers to the study with nematode eggs (Beams and King, 1936). Therefore, to our knowledge, this is the first time that an adult animal is shown to tolerate 400,000*xg*, orders of

magnitude above conventional studies (1-100xg) (Kim et al. 2007; Sasagawa et al., 2003; Qiao et al. 2013). Curiously, desiccated worms display a much lower tolerance than hydrated ones. This may be due the fact that the bioglass, as a solid matrix (Hengherr et al., 2009), is susceptible to damages in its structure and/or integrity due to the tensional forces experienced during the hyperaccelerations, and/or the movement/collapse of the membrane on which the worms are immobilized. All these stressing physical forces probably cause ruptures within the bioglass, thus decreasing the viability of the desiccated worms.

The fact that adult *P. superbus* withstands hyperaccelerations may have implications in diverse and fundamental aspects of biology. Perhaps the most important involves the physical limits that constrain the existence of life (Rothschild and Mancinelli, 2001). The present evidence that a multicellular organism tolerates such condition extends the range of possible inhabitable planets, thus setting the foundation to consider the existence of biological activities also in much more massive celestial bodies, which display much higher gravitational forces.

It is also important to highlight that the natural and continuous exchange of mass among planets (Pizzarello and Cronin, 1998) also involves equivalent hyperacceleration forces for short periods, either during the ejection of a rock caused by intense eruption or the impact of a meteorite. Therefore, organisms located on such rocks might survive such events, helping understand the origin and distribution of life in the universe.

#### Conclusions

Our data evidence that *P. superbus* presents remarkable survival potential to freezing, radiation and hyperacceleration even in the hydrated state. However, anhydrobiosis potentiates its survival in extremes of temperature, providing the additional capacity needed to withstand severe droughts or freezing observed in its natural environments. The surprising observation that hydrated *P. superbus* is fully tolerant to such hyperacceleration (400,000xg for 1 h) extends the known limits of tolerance to *g*- forces for adult animals in orders of magnitude, raising new and fundamental questions about the limits of life. Finally, due to its intrinsic survival potential (in the hydrated and desiccated states), *P. superbus* might also be exploited as a model in astrobiology.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Gouvêa de Lima AS and Bárbara Aparecida Santana A from radiology section of the University of São Paulo Hospital (FMRP/USP) for help us during X-rays irradiation procedures. We are also thankful to Prof. Roy Edward Larson (FMRP/USP) for granting us access to the ultracentrifuge. We also thank Prof. de Souza Goldman MH and Dr. Lubini G for important discussions. TAJS and GJC are recipients of studentships from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil).

#### References

Alcock R, Cottingham MG, Rollier CS, Furze J, De Costa SD, Hanlon M, *et al.* Long-term thermostabilization of live poxviral and adenoviral vaccine vectors at supraphysiological temperatures in carbohydrate glass. Sci. Transl. Med. 2: 19ra12, 2010.

Beams HW, King R. Survival of *Ascaris* eggs after centrifuging. Science 84: 138, 1936.

Beltrán-Pardo E, Jönsson KI, Wojcik A, Haghdoost S, Harms-Ringdahl M, Bermúdez-Cruz RM, *et al.* Effects of ionizing radiation on embryos of the tardigrade *Milnesium cf. tardigradum* at different stages of development. PLOS ONE 8 (9): e72098, 2013.

Beltrán-Pardo E, Jönsson KI, Harms-Ringdahl M, Haghdoost S, Wojcik A. Tolerance to gamma radiation in the tardigrade *Hypsibius dujardini* from embryo to adult correlate inversely with cellular proliferation. PLOS ONE 10 (7):

e0133658, 2015.

Boothby TC, Tapia H, Brozena AH, Piszkiewicz S, Smith AE, Giovannini I, *et al.* Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation. Mol. Cell 65: 975-984.e5, 2017. Buitink J, Leprince O. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. Cryobiology 48: 215-28, 2004.

Chang CL, Villalun M, Geib SM, Goodman CL, Ringbauer J, Stanley D. Pupal X-ray irradiation influences protein expression in adults of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. J. Insect Physiol. 76: 7-16, 2015.

Clegg JS. Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization. Comp. Biochem. Physiol. 128B: 613-624, 2001.

Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. Anhydrobiosis. Annu. Rev. Physiol. 54: 579-599, 1992.

Deguchi S, Shimoshige H, Tsudome M, Mukai SA, Corkery RW, Ito S, *et al.* Microbial growth at hyperaccelerations up to 403,627xg. Proc. Natl. Acad.

Sci USA 108: 7997-8002, 2011. Eisenback JD, Wei M, Roane CW. Heat Tolerance and Aging of the Anhydrobiotic Seed Gall Nematode with SEM Observations. J. Nematol. 45: 43-48, 2013.

Erkut C, Penkov S, Khesbak H, Vorkel D, Verbavatz JM, Fahmy K, *et al.* Trehalose renders the dauer larva of Caenorhabditis elegans resistant to extreme desiccation. Curr. Biol. 21: 1331- 1336, 2011.

Fuchs G. Neue an Borkenkafer und Russelkafer Gebundene Nematoden, Halbparasitische und Wohnuungseinmieter. Zoologische Jahrbucher 59: 586-608, 1930.

Gladyshev E, Meselson M. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 5139-5144, 2008.

Hengherr S, Schill RO, Clegg JS. Mechanisms associated with cellular desiccation tolerance in the animal extremophile artemia. Physiol. Biochem. Zool. 84 :249-57, 2011.

Hengherr S, Worland MR, Reuner A, Brümmer F, Schill RO. High-temperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. Physiol. Biochem. Zool. 82: 749-755, 2009.

Horikawa DD, Sakashita T, Katagiri C, Watanabe M, Kikawada T, Nakahara Y, *et al.* Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum.* Int. J. Radiat. Biol. 82: 843-848, 2006.

Horikawa DD, Kunieda T, Abe W, Watanabe M, Nakahara Y, Yukuhiro F, *et al.* Establishment of a rearing system of the extremotolerant tardigrade *Ramazzottius varieornatus*: a new model animal for astrobiology. Astrobiology 8: 549-556, 2008.

Horikawa DD, Iwata K, Kawai K, Koseki S, Okuda T, Yamamoto K. High hydrostatic pressure tolerance of four different anhydrobiotic animal species. Zoolog. Sci. 26: 238-242, 2009.

Jönsson KI, Rabbow E, Schill RO. Harms-Ringdahl, M., Rettberg, P. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. Curr. Biol. 18: 729-731, 2008.

Kim N, Dempsey CM, Kuan CJ, Zoval JV, O'rourke E, Ruvkun G, *et al.* Gravity force transduced by the MEC-4/MEC-10 DEG/ENaC channel modulates DAF-16/FoxO activity in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 177: 835-845, 2007.

Krause AW, Carley WW, Webb WW. Fluorescent erythrosin B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture. J. Histochem. Cytochem. 32: 1084-1090, 1984.

Nilsson EJ, Jönsson KI, Pallon J. Tolerance to proton irradiation in the eutardigrade *Richtersius coronifer* - a nuclear microprobe study. Int. J. Radiat. Biol. 86: 420-427, 2010.

McGill LM, Shannon AJ, Pisani D, Félix MA, Ramløv H, Dix I, *et al.* Anhydrobiosis and freezing- tolerance: adaptations that facilitate the establishment of *Panagrolaimus* nematodes in polar habitats. PLOS ONE 10(3): e0116084, 2015.

Morey-Holton, ER. The impact of gravity on life. In: Rothschild LJ (ed.), Evolution on planet earth: the impact of the physical environment, Academic Press, Cambridge, Unites States, pp 143-159, 2003.

Onodera A, Yanase S, Ishii T, Yasuda K, Miyazawa M, Hartman PS, *et al.* Post-dauer life span of *Caenorhabditis elegans* dauer larvae can be modified by X-irradiation. J. Radiat. Res. 51: 67-71, 2010.

Pizzarello S, Cronin JR. Alanine enantiomers in the Murchison meteorite. Nature 394: 236, 1998.

Qiao L, Luo S, Liu Y, Li X, Wang G, Huang Z. Reproductive and locomotory capacities of *Caenorhabditis elegans* were not affected by simulated variable gravities and spaceflight during the Shenzhou-8 mission. Astrobiology 13: 617-625, 2013.

Rampelotto PH. Extremophiles and Extreme Environments. Life (Basel) 3: 482-485, 2013.

Rebecchi L, Altiero T, Guidetti, R. Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. Inv. Surv. J. 4: 65-81, 2007. Rothschild LJ, Mancinelli RL. Life in extreme environments. Nature 409: 1092-1101, 2001.

Sakurai M, Furuki T, Akao K, Tanaka D, Nakahara Y, Kikawada T, *et al.* Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 5093-5098, 2008.

Sasagawa Y, Saito Y, Shimizu M, Takahashi H, Ishioka N, Fukui K, *et al.* Effects of gravity on early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. Biol. Sci. Space J. 17: 217-218, 2003.

Shannon AJ, Browne JA, Boyd J, Fitzpatrick DA, Burnell AM. The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics<br/>of species and strains ofPanagrolaimus(Nematoda, Panagrolaimidae). J. Exp. Biol. 208: 2433-<br/>2445,

2005.

Tunnacliffe A, Lapinski J. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. Philos. Trans. R. Soc. London [Biol] 358 (1438): 1755-1771, 2003.

Watanabe M, Sakashita T, Fujita A, Kikawada T, Horikawa DD, Nakahara Y, *et al.* Biological effects of anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki* on radiation tolerance. Int. J. Radiat. Biol. 8: 587- 592, 2006. Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbeck D, Petranovic M, *et al.* Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. Nature 443: 569-573, 2006.

# 8.2. APÊNDICE II

Imagem ilustrativa dos resultados da coloração de vermes por eritrosina



Figura 1. Imagem de dois vermes *C. elegans*. O indivíduo adulto se encontra vivo (não corado com eritrosina) enquanto que a larva (L2) se encontra morta (corada com eritrosina).

# 8.3. APÊNDICE III

Imagens ilustrativas de aspectos morfológicos e comportamentais de C. elegans



Figura 1. Esquema ilustrativo dos parâmetros morfológicos avaliados após a exposição de vermes *C. elegans* a 400.000 x g durante 1h. A espessura de vermes saudáveis é utilizada como parâmetro para distinguir os indivíduos de diferentes estadios. Imagem modificada do WormAtlas.



Figura 2. Imagem do fenótipo de *rolling* observado em *C. elegans* no qual o movimento ao redor do próprio eixo corporal pode ser claramente visualizado. Em indivíduos que apresentam esse fenótipo, esse movimento estereotipado é realizado repetidamente. Imagem modificada de Corsi et al., 2015.

## 8.4. APÊNDICE IV

Descrição dos diferentes programas da ferramenta BLAST utilizados nas análises *in silico* desse trabalho.

#### **Ferramenta BLAST**

A Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLAST) é um algoritmo capaz de localizar regiões de similaridade local entre sequências. O programa BLAST compara sequências de nucleotídeos ou aminoácidos com a bases de dados de sequências e calcula a significância estatística dos resultados. O BLAST pode ser usado para inferir relações funcionais e evolutivas entre sequências, bem como ajudar a identificar os membros de famílias de genes. Essa ferramenta foi utilizada em diversas análises *in silico* realizadas no presente trabalho. Mais especificadamente foram utilizados aos algoritmos BLASTp, BLASTn, tBLASTn e tBLASTx. O BLASTp é capaz de encontrar sequências de aminoácidos similares à sequência de uma determinada proteína utilizada como isca e o BLASTn é capaz de encontrar sequências nucleotídicas similares à sequência de uma sequência nucleotídica utilizada como isca. Já o tBLASTn é capaz de encontrar sequências nucleotídicas que codificam proteínas semelhantes a uma isca proteica. Por fim, o tBLASTx é capaz de identificar sequências nucleotídicas com a potencialidade de codificar proteínas semelhantes a potencial(is) proteína(s) codificada(s) por uma determinada sequência nucleotídica utilizada como isca.

# 8.5. APÊNDICE V

# Descrição dos termos utilizados para descrever os resultados das buscas realizadas por meio da ferramenta BLAST

Termos	Descrição
	Número de diferentes alinhamentos com pontuações equivalentes ou melhores do que se
e-value	esperava ocorrer ao acaso em uma busca no banco de dados.
Expect	Parâmetro filtra os resultados do BLAST que são menos significativos do que o esperado em
threshould	função da configuração inicial da busca.
	Número de aminoácidos idênticos entre a sequência isca e a presente nos hits gerados pela
Identities	busca (BLAST).
Max matches in a	Limita os resultados salvos para uma determinada região da isca (como repetições) em um
query range	BLAST, assim, os resultados para outra região da isca não são eliminados.
Matrix	Determina o tipo de matriz que será utilizada no BLAST.
	Valor máximo gerado por um sistema de pontuação estatística que categoriza os diversos
Max score	resultados produzidos a partir da busca (BLAST).
Max target	
sequences	Número máximo de sequências geradas por uma busca utilizando a ferramenta BLAST.
•	Cobertura da sequência gerada nos resultados alinhada à sequência inicialmente utilizada como
Query Cover	isca.
	Parâmetro do BLAST que define o tamanho da fase seminal de correspondência. Configurações
Word size	com valores menores são mais sensíveis.
Gap Costs	Parâmetro que especifica como as lacunas introduzidas no alinhamento devem ser penalizadas.
Compositional	
adjustments	Tipo de ajustes da pontuação da matrix.
Match/Missmatc	Parametro que atribui recompensas para combinações de nucleotídeos e penalidades para
h scores	incompatibilidades de nucleotídeos.
	Parâmetro que especifica a forma como as sequências de baixa complexidade e as repetições
Filter	específicas dos organismos devem ser filtradas
Mask	Parâmetro que determina a porção da sequência que será filtrada
	Valor total gerado por um sistema de pontuação estatística que categoriza os diversos
Total score	resultados produzidos a partir da busca (BLAST)

## 8.6. APÊNDICE VI

Análise comparativa do códon usage das espécies *A. thaliana*, *C. elegans*, *G. max. P. sojae*.

Tabela 1. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos em *C. elegans*.

Caenorhabditis elegans [gbinv]: 24994 CDS's (11197796 codons) fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number]) UUU 23.3(260624) UCU 16.7(187184) UAU 17.5(195860) UGU 11.2(125864) UUC 23.9(267710) UCC 10.6(118939) UAC 13.7(153317) UGC 9.1(101993) UUA 9.8(110258) UCA 20.6(230820) UAA 1.6(17653) UGA 1.4(15994) UUG 20.0(224208) UCG 12.2(136457) UAG 0.6(7245) UGG 11.1(123925) CUU 21.2(236968) CCU 8.8( 98666) CAU 14.1(158091) CGU 11.2(125440) CUC 14.8(166037) CCC 4.4( 49300) CAC 9.2(102747) CGC 5.1( 57149) CUA 7.9( 88086) CCA 26.1(292755) CAA 27.4(306929) CGA 12.1(135391) CUG 12.1(135836) CCG 9.7(108479) CAG 14.4(160920) CGG 4.7( 52902) AUU 32.2(360846) ACU 18.9(211659) AAU 30.2(337956) AGU 12.1(135726) AUC 18.9(211592) ACC 10.4(115954) AAC 18.3(205008) AGC 8.4( 93596) AUA 9.5(106074) ACA 20.0(224368) AAA 37.5(419559) AGA 15.4(172826) AUG 26.1(292175) ACG 8.9(99441) AAG 25.8(289397) AGG 4.0(44270) GUU 24.1(269560) GCU 22.4(250829) GAU 35.8(400841) GGU 10.9(122203) GUC 13.6(151950) GCC 12.6(141585) GAC 17.1(191126) GGC 6.7(74950) GUA 9.8(109949) GCA 19.8(221831) GAA 40.8(457346) GGA 31.7(354969) GUG 14.3(160677) GCG 8.2( 91816) GAG 24.5(274607) GGG 4.4( 49363) Coding GC 42.93% 1st letter GC 50.00% 2nd letter GC 39.00% 3rd letter GC 39.78%

Tabela 2. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína dnj-16 de *C. elegans*.

fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])													
UUC	27.8(	11)	UCC	7.6(	3)	UAC	12.6(	5)	UGC	0.0(	0)		
UUA	7.6(	3)	UCA	25.3(	10)	UAA	0.0(	0)	UGA	2.5(	1)		
UUG	20.2(	8)	UCG	10.1(	4)	UAG	0.0(	0)	UGG	5.1(	2)		
CUU	17.7(	7)	CCU	10.1(	4)	CAU	17.7(	7)	CGU	12.6(	5)		
CUC	12.6(	5)	CCC	5.1(	2)	CAC	7.6(	3)	CGC	0.0(	0)		
CUA	0.0(	0)	CCA	22.7(	9)	CAA	32.8(	13)	CGA	15.2(	6)		
CUG	15.2(	6)	CCG	5.1(	2)	CAG	25.3(	10)	CGG	2.5(	1)		
AUU	30.3(	12)	ACU	15.2(	6)	AAU	27.8(	11)	AGU	12.6(	5)		
AUC	10.1(	4)	ACC	5.1(	2)	AAC	5.1(	2)	AGC	7.6(	3)		
AUA	7.6(	3)	ACA	17.7(	7)	AAA	58.1(	23)	AGA	10.1(	4)		
AUG	27.8(	11)	ACG	2.5(	1)	AAG	35.4(	14)	AGG	0.0(	0)		
GUU	30.3(	12)	GCU	20.2(	8)	GAU	37.9(	15)	GGU	15.2(	6)		
GUC	15.2(	6)	GCC	10.1(	4)	GAC	12.6(	5)	GGC	0.0(	0)		
GUA	12.6(	5)	GCA	27.8(	11)	GAA	55.6(	22)	GGA	35.4(	14)		
GUG	12.6(	5)	GCG	15.2(	6)	GAG	27.8(	11)	GGG	5.1(	2)		

dnj-16 [C. elegans] (396 codons)
Tabela 3. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína actin-1 de *C. elegans*.

act-	ct-1 [C. elegans] (377 codons)												
field	fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])												
UUU	0.0(	0)	UCU	15.9(	6)	UAU	5.3(	2)	UGU	2.7(	1)		
UUC	31.8(	12)	UCC	47.7(	18)	UAC	37.1(	14)	UGC	13.3(	5)		
UUA	0.0(	0)	UCA	2.7(	1)	UAA	2.7(	1)	UGA	0.0(	0)		
UUG	8.0(	3)	UCG	2.7(	1)	UAG	0.0(	0)	UGG	10.6(	4)		
CUU	23.9(	9)	CCU	2.7(	1)	CAU	5.3(	2)	CGU	34.5(	13)		
CUC	39.8(	15)	CCC	0.0(	0)	CAC	18.6(	7)	CGC	8.0(	3)		
CUA	0.0(	0)	CCA	47.7(	18)	CAA	21.2(	8)	CGA	0.0(	0)		
CUG	0.0(	0)	CCG	0.0(	0)	CAG	10.6(	4)	CGG	0.0(	0)		
AUU	10.6(	4)	ACU	10.6(	4)	AAU	8.0(	3)	AGU	0.0(	0)		
AUC	58.4(	22)	ACC	55.7(	21)	AAC	15.9(	6)	AGC	0.0(	0)		
AUA	0.0(	0)	ACA	0.0(	0)	AAA	0.0(	0)	AGA	5.3(	2)		
AUG	45.1(	17)	ACG	0.0(	0)	AAG	50.4(	19)	AGG	0.0(	0)		
GUU	13.3(	5)	GCU	31.8(	12)	GAU	18.6(	7)	GGU	15.9(	6)		
GUC	45.1(	17)	GCC	47.7(	18)	GAC	39.8(	15)	GGC	2.7(	1)		
GUA	2.7(	1)	GCA	0.0(	0)	GAA	26.5(	10)	GGA	55.7(	21)		
GUG	2.7(	1)	GCG	0.0(	0)	GAG	45.1(	17)	GGG	0.0(	0)		

act-1 [C. elegans] (377 codons)

Tabela 4. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína Histone-4 de *C. elegans*.

His	Histone H4 [Caenorhabditis elegans] (104 codons)											
fiel	ds: [triplet]	[fre	quen	cy: per	thousar	1d] (	[number])	)				
UUU	0.0(	0)	UCU	9.6(	1)	UAU	9.6(	1)	UGU 0.0(	0)		
UUC	19.2(	2)	UCC	9.6(	1)	UAC	28.8(	3)	UGC 9.6(	1)		
UUA	0.0(	0)	UCA	0.0(	0)	UAA	9.6(	1)	UGA 0.0(	0)		
UUG	9.6(	1)	UCG	0.0(	0)	UAG	0.0(	0)	UGG 0.0(	0)		
CUU	28.8(	3)	CCU	0.0(	0)	CAU	9.6(	1)	CGU 76.9(	8)		
CUC	28.8(	3)	CCC	0.0(	0)	CAC	9.6(	1)	CGC 9.6(	1)		
CUA	0.0(	0)	CCA	0.0(	0)	CAA	19.2(	2)	CGA 0.0(	0)		
CUG	9.6(	1)	CCG	9.6(	1)	CAG	0.0(	0)	CGG 0.0(	0)		
AUU	9.6(	1)	ACU	9.6(	1)	AAU	9.6(	1)	AGU 0.0(	0)		
AUC	48.1(	5)	ACC	38.5(	4)	AAC	9.6(	1)	AGC 0.0(	0)		
AUA	0.0(	0)	ACA	9.6(	1)	AAA	28.8(	3)	AGA 48.1(	5)		
AUG	19.2(	2)	ACG	0.0(	0)	AAG	76.9(	8)	AGG 0.0(	0)		
GUU	9.6(	1)	GCU	0.0(	0)	GAU	28.8(	3)	GGU 19.2(	2)		
GUC	48.1(	5)	GCC	57.7(	6)	GAC	0.0(	0)	GGC 9.6(	1)		
GUA	0.0(	0)	GCA	9.6(	1)	GAA	9.6(	1)	GGA134.6(	14)		
GUG	28.8(	3)	GCG	0.0(	0)	GAG	28.8(	3)	GGG 0.0(	0)		

Tabela 5. Frequência de utilização de códons específicos para a produção dos diferentes aminoácidos em *A. thaliana*.

Arabidopsis thaliana [gbpln]: 80395 CDS's (31098475 codons) fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number]) UUU 21.8(678320) UCU 25.2(782818) UAU 14.6(455089) UGU 10.5(327640) UUC 20.7(642407) UCC 11.2(348173) UAC 13.7(427132) UGC 7.2(222769) UUA 12.7(394867) UCA 18.3(568570) UAA 0.9(29405) UGA 1.2(36260) UUG 20.9(649150) UCG 9.3(290158) UAG 0.5( 16417) UGG 12.5(388049) CUU 24.1(750114) CCU 18.7(580962) CAU 13.8(428694) CGU 9.0(280392) CUC 16.1(500524) CCC 5.3(165252) CAC 8.7(271155) CGC 3.8(117543) CUA 9.9(307000) CCA 16.1(502101) CAA 19.4(604800) CGA 6.3(195736) CUG 9.8(305822) CCG 8.6(268115) CAG 15.2(473809) CGG 4.9(151572) AUU 21.5(668227) ACU 17.5(544807) AAU 22.3(693344) AGU 14.0(435738) AUC 18.5(576287) ACC 10.3(321640) AAC 20.9(650826) AGC 11.3(352568) AUA 12.6(391867) ACA 15.7(487161) AAA 30.8(957374) AGA 19.0(589788) AUG 24.5(762852) ACG 7.7(240652) AAG 32.7(1016176) AGG 11.0(340922) GUU 27.2(847061) GCU 28.3(880808) GAU 36.6(1139637) GGU 22.2(689891) GUC 12.8(397008) GCC 10.3(321500) GAC 17.2(535668) GGC 9.2(284681) GUA 9.9(308605) GCA 17.5(543180) GAA 34.3(1068012) GGA 24.2(751489) GUG 17.4(539873) GCG 9.0(280804) GAG 32.2(1002594) GGG 10.2(316620)

Coding GC 44.59% 1st letter GC 50.84% 2nd letter GC 40.54% 3rd letter GC 42.38%

Tabela 6. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína ARG1 de *A. thaliana*.

AI												
fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])												
υυυ	29.2(	12)	UCU	17.0(	7)	UAU	24.3(	10)	UGU	7.3(	3)	
UUC	19.5(	8)	UCC	4.9(	2)	UAC	9.7(	4)	UGC	2.4(	1)	
UUA	14.6(	6)	UCA	19.5(	8)	UAA	0.0(	0)	UGA	2.4(	1)	
UUG	21.9(	9)	UCG	12.2(	5)	UAG	0.0(	0)	UGG	2.4(	1)	
CUU	19.5(	8)	CCU	17.0(	7)	CAU	12.2(	5)	CGU	2.4(	1)	
CUC	9.7(	4)	CCC	0.0(	0)	CAC	2.4(	1)	CGC	0.0(	0)	
CUA	7.3(	3)	CCA	2.4(	1)	CAA	29.2(	12)	CGA	7.3(	3)	
CUG	7.3(	3)	CCG	7.3(	3)	CAG	9.7(	4)	CGG	9.7(	4)	
AUU	12.2(	5)	ACU	17.0(	7)	AAU	29.2(	12)	AGU	14.6(	6)	
AUC	9.7(	4)	ACC	12.2(	5)	AAC	19.5(	8)	AGC	17.0(	7)	
AUA	4.9(	2)	ACA	31.6(	13)	AAA	34.1(	14)	AGA	19.5(	8)	
AUG	17.0(	7)	ACG	7.3(	3)	AAG	56.0(	23)	AGG	7.3(	3)	
GUU	34.1(	14)	GCU	41.4(	17)	GAU	43.8(	18)	GGU	17.0(	7)	
GUC	4.9(	2)	GCC	7.3(	3)	GAC	12.2(	5)	GGC	12.2(	5)	
GUA	9.7(	4)	GCA	24.3(	10)	GAA	51.1(	21)	GGA	26.8(	11)	
GUG	12.2(	5)	GCG	14.6(	6)	GAG	36.5(	15)	GGG	12.2(	5)	

#### ARG1 [A. thaliana] (411 codons)

Tabela 7. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína ACT2 de *A. thaliana*.

AC	C12 [A. manana] (578 couons)											
fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])												
UUU	15.9(	6)	UCU	13.2(	5)	UAU	15.9(	6)	UGU	7.9(	3)	
UUC	21.2(	8)	UCC	18.5(	7)	UAC	21.2(	8)	UGC	2.6(	1)	
UUA	2.6(	1)	UCA	7.9(	3)	UAA	2.6(	1)	UGA	0.0(	0)	
UUG	7.9(	3)	UCG	2.6(	1)	UAG	0.0(	0)	UGG	10.6(	4)	
CUU	31.7(	12)	CCU	15.9(	6)	CAU	13.2(	5)	CGU	13.2(	5)	
CUC	15.9(	6)	CCC	13.2(	5)	CAC	13.2(	5)	CGC	0.0(	0)	
CUA	0.0(	0)	CCA	21.2(	8)	CAA	13.2(	5)	CGA	0.0(	0)	
CUG	5.3(	2)	CCG	0.0(	0)	CAG	13.2(	5)	CGG	2.6(	1)	
AUU	26.5(	10)	ACU	13.2(	5)	AAU	5.3(	2)	AGU	10.6(	4)	
AUC	47.6(	18)	ACC	26.5(	10)	AAC	21.2(	8)	AGC	15.9(	6)	
AUA	0.0(	0)	ACA	18.5(	7)	AAA	5.3(	2)	AGA	21.2(	8)	
AUG	45.0(	17)	ACG	2.6(	1)	AAG	47.6(	18)	AGG	10.6(	4)	
GUU	34.4(	13)	GCU	42.3(	16)	GAU	42.3(	16)	GGU	52.9(	20)	
GUC	15.9(	6)	GCC	13.2(	5)	GAC	15.9(	6)	GGC	0.0(	0)	
GUA	2.6(	1)	GCA	21.2(	8)	GAA	26.5(	10)	GGA	18.5(	7)	
GUG	21.2(	8)	GCG	0.0(	0)	GAG	47.6(	18)	GGG	5.3(	2)	

ACT2 [A. thaliana] (378 codons)

Tabela 8. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína H4 de *A. thaliana*.

<b>H4</b>	4 [A. thaliana] (104 codons)										
field	ds: [triplet	] [fre	quen	cy: <mark>per t</mark>	housai	1d] (	[number]	)			
UUU	9.6(	1)	UCU	0.0(	0)	UAU	0.0(	0)	UGU	0.0(	0)
UUC	9.6(	1)	UCC	0.0(	0)	UAC	38.5(	4)	UGC	0.0(	0)
UUA	0.0(	0)	UCA	0.0(	0)	UAA	9.6(	1)	UGA	0.0(	0)
UUG	19.2(	2)	UCG	9.6(	1)	UAG	0.0(	0)	UGG	0.0(	0)
CUU	9.6(	1)	CCU	9.6(	1)	CAU	0.0(	0)	CGU	57.7(	6)
CUC	38.5(	4)	CCC	0.0(	0)	CAC	19.2(	2)	CGC	0.0(	0)
CUA	0.0(	0)	CCA	0.0(	0)	CAA	19.2(	2)	CGA	9.6(	1)
CUG	9.6(	1)	CCG	0.0(	0)	CAG	0.0(	0)	CGG	0.0(	0)
AUU	19.2(	2)	ACU	38.5(	4)	AAU	0.0(	0)	AGU	9.6(	1)
AUC	48.1(	5)	ACC	28.8(	3)	AAC	19.2(	2)	AGC	0.0(	0)
AUA	0.0(	0)	ACA	0.0(	0)	AAA	9.6(	1)	AGA	28.8(	3)
AUG	19.2(	2)	ACG	0.0(	0)	AAG	86.5(	9)	AGG	48.1(	5)
GUU	19.2(	2)	GCU	38.5(	4)	GAU	19.2(	2)	GGU	67.3(	7)
GUC	38.5(	4)	GCC	19.2(	2)	GAC	9.6(	1)	GGC	9.6(	1)
GUA	0.0(	0)	GCA	0.0(	0)	GAA	0.0(	0)	GGA	86.5(	9)
GUG	19.2(	2)	GCG	9.6(	1)	GAG	38.5(	4)	GGG	0.0(	0)

Tabela 9. Frequência de utilização de códons específicos para a produção dos diferentes aminoácidos em *G. max*.

Glycine max [gbpln]: 1207 CDS's (495060 codons) fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number]) UUU 21.2( 10493) UCU 18.4( 9107) UAU 15.7( 7779) UGU 8.1( 3995) 6409) UAC 14.9( 7367) UUC 21.2( 10487) UCC 12.9( UGC 8.0( 3980) UUA 9.2( 4545) UCA 15.6( 7712) UAA 0.9( 463) UGA 1.0( 480) UUG 22.9( 11340) UCG 4.8( 2397) UAG 0.5( 263) UGG 13.0( 6412) CUU 23.9( 11829) CCU 18.9( 9358) CAU 14.0( 6930) CGU 6.6( 3291) 
 CUC 17.1(
 8479)
 CCC 10.1(
 5010)
 CAC 11.6(
 5759)
 CGC 6.2(
 3093)

 CUA 8.5(
 4216)
 CCA 19.1(
 9461)
 CAA 20.5(
 10162)
 CGA 4.1(
 2018)

 CUG 12.7(
 6304)
 CCG 4.7(
 2312)
 CAG 16.2(
 8038)
 CGG 3.1(
 1510)
 AUU 25.1( 12411) ACU 17.1( 8490) AAU 22.4( 11088) AGU 12.6( 6237) AUC 16.3( 8071) ACC 14.3( AUA 12.9( 6386) ACA 14.9( 7100) AAC 22.8( 11284) AGC 11.3( 5594) 7391) AAA 26.9(13334) AGA 14.8( 7337) AUG 22.7( 11218) ACG 4.3( 2147) AAG 35.9( 17797) AGG 13.3( 6574) GUU 26.1( 12911) GCU 26.7( 13201) GAU 32.4( 16040) GGU 20.9( 10353) GUC 11.9(5894)GCC 16.2(8026)GAC 20.4(10097)GUA 7.7(3803)GCA 21.4(10577)GAA 33.2(16438) GGC 13.4( 6650) GGA 22.3( 11022) GUG 21.4( 10610) GCG 6.3( 3123) GAG 33.2( 16426) GGG 13.0( 6431) Coding GC 45.95% 1st letter GC 52.39% 2nd letter GC 39.75% 3rd letter GC 45.69%

Tabela 10. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína LOC102668432 de *G. max*.

Glycine n	1ax LOC	102668	432 (336 co	odons	)				
fields: [trij	plet] [fre	quency:	per thousa	nd] (	[numbe	r])			
UUU 23.8(	8)	UCU 38	.7( 13)	UAU	17.9(	6)	UGU	8.9(	3)
UUC 26.8(	9)	UCC 20	.8( 7)	UAC	3.0(	1)	UGC	8.9(	3)
UUA 14.9(	5)	UCA 14	.9( 5)	UAA	0.0(	0)	UGA	3.0(	1)
UUG 50.6(	17)	UCG 8	.9( 3)	UAG	0.0(	0)	UGG	14.9(	5)
CUU 29.8(	10)	CCU 8	.9( 3)	CAU	17.9(	6)	CGU	14.9(	5)
CUC 14.9(	5)	CCC 3	.0( 1)	CAC	6.0(	2)	CGC	0.0(	0)
CUA 11.9(	4)	CCA 11	.9( 4)	CAA	35.7(	12)	CGA	6.0(	2)
CUG 11.9(	4)	CCG 3	.0( 1)	CAG	3.0(	1)	CGG	6.0(	2)
AUU 23.8(	8)	ACU 6	.0( 2)	AAU	29.8(	10)	AGU	26.8(	9)
AUC 11.9(	4)	ACC 3	.0( 1)	AAC	17.9(	6)	AGC	23.8(	8)
AUA 6.0(	2)	ACA 26	.8( 9)	AAA	32.7(	11)	AGA	6.0(	2)
AUG 23.8(	8)	ACG 3	.0( 1)	AAG	23.8(	8)	AGG	6.0(	2)
GUU 14.9(	5)	GCU 11	.9( 4)	GAU	32.7(	11)	GGU	8.9(	3)
GUC 14.9(	5)	GCC 17	.9( 6)	GAC	17.9(	6)	GGC	8.9(	3)
GUA 14.9(	5)	GCA 23	.8( 8)	GAA	32.7(	11)	GGA	17.9(	6)
GUG 20.8(	7)	GCG 8	.9( 3)	GAG	20.8(	7)	GGG	20.8(	7)

Tabela 11. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína act-11 de *G. max*.

			·		~								
field	fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])												
UUU	7.9(	3)	UCU 1	18.5(	7)	UAU	21.2(	8)	UGU	5.3(	2)		
UUC	23.8(	9)	UCC 1	0.6(	4)	UAC	18.5(	7)	UGC	5.3(	2)		
UUA	2.6(	1)	UCA 1	15.9(	6)	UAA	2.6(	1)	UGA	0.0(	0)		
UUG	18.5(	7)	UCG	0.0(	0)	UAG	0.0(	0)	UGG	10.6(	4)		
CUU	26.5(	10)	CCU 2	21.2(	8)	CAU	15.9(	6)	CGU	26.5(	10)		
CUC	10.6(	4)	CCC 1	10.6(	4)	CAC	7.9(	3)	CGC	0.0(	0)		
CUA	0.0(	0)	CCA 2	21.2(	8)	CAA	18.5(	7)	CGA	0.0(	0)		
CUG	13.2(	5)	CCG	0.0(	0)	CAG	7.9(	3)	CGG	2.6(	1)		
AUU	45.0(	17)	ACU 2	23.8(	9)	AAU	10.6(	4)	AGU	5.3(	2)		
AUC	26.5(	10)	ACC 2	23.8(	9)	AAC	10.6(	4)	AGC	23.8(	9)		
AUA	2.6(	1)	ACA 1	15.9(	6)	AAA	10.6(	4)	AGA	10.6(	4)		
AUG	42.3(	16)	ACG	0.0(	0)	AAG	39.7(	15)	AGG	10.6(	4)		
GUU	29.1(	11)	GCU 2	21.2(	8)	GAU	42.3(	16)	GGU	42.3(	16)		
GUC	13.2(	5)	GCC 2	23.8(	9)	GAC	18.5(	7)	GGC	10.6(	4)		
GUA	10.6(	4)	GCA 2	29.1(	11)	GAA	26.5(	10)	GGA	21.2(	8)		
GUG	15.9(	6)	GCG	0.0(	0)	GAG	47.6(	18)	GGG	2.6(	1)		

actin-11 [G. max] (378 codons)

.

Tabela 12. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína H4 de *G. max*.

<b>H4</b>	[G. max	] (104	codo	ns)							
field	ds: [triple	et] [free	quenc	y: per t	housa	nd] (	[number]	)			
υυυ	0.0(	0)	UCU	0.0(	0)	UAU	9.6(	1)	UGU	0.0(	0)
UUC	19.2(	2)	UCC	0.0(	0)	UAC	28.8(	3)	UGC	0.0(	0)
UUA	0.0(	0)	UCA	0.0(	0)	UAA	9.6(	1)	UGA	0.0(	0)
UUG	19.2(	2)	UCG	9.6(	1)	UAG	0.0(	0)	UGG	0.0(	0)
CUU	9.6(	1)	CCU	0.0(	0)	CAU	0.0(	0)	CGU	38.5(	4)
CUC	48.1(	5)	CCC	9.6(	1)	CAC	19.2(	2)	CGC	19.2(	2)
CUA	0.0(	0)	CCA	0.0(	0)	CAA	0.0(	0)	CGA	0.0(	0)
CUG	0.0(	0)	CCG	0.0(	0)	CAG	19.2(	2)	CGG	9.6(	1)
AUU	19.2(	2)	ACU	9.6(	1)	AAU	0.0(	0)	AGU	9.6(	1)
AUC	48.1(	5)	ACC	48.1(	5)	AAC	19.2(	2)	AGC	0.0(	0)
AUA	0.0(	0)	ACA	9.6(	1)	AAA	9.6(	1)	AGA	38.5(	4)
AUG	19.2(	2)	ACG	0.0(	0)	AAG	86.5(	9)	AGG	38.5(	4)
GUU	57.7(	6)	GCU	48.1(	5)	GAU	9.6(	1)	GGU	86.5(	9)
GUC	9.6(	1)	GCC	9.6(	1)	GAC	19.2(	2)	GGC	28.8(	3)
GUA	0.0(	0)	GCA	9.6(	1)	GAA	0.0(	0)	GGA	48.1(	5)
GUG	9.6(	1)	GCG	0.0(	0)	GAG	38.5(	4)	GGG	0.0(	0)

Tabela 13. Frequência de utilização de códons específicos para a produção dos diferentes aminoácidos em *P. sojae*.

•

fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])												
UUU	5.3(	215)	UCU 7.3(	298)	UAU 2.6(	105)	UGU	3.9(	158)			
UUC	28.0(	1135)	UCC 18.0(	731)	UAC 30.4(	1235)	UGC :	17.1(	694)			
UUA	1.4(	55)	UCA 6.2(	252)	UAA 1.6(	64)	UGA	0.7(	28)			
JUG	10.3(	417)	UCG 34.3(	1391)	UAG 1.0(	42)	UGG :	13.8(	559)			
UU	7.1(	287)	CCU 6.5(	264)	CAU 2.9(	118)	CGU	7.4(	302)			
CUC	25.5(	1036)	CCC 15.4(	624)	CAC 12.9(	523)	CGC :	16.6(	672)			
CUA	3.4(	140)	CCA 5.8(	234)	CAA 5.6(	229)	CGA	5.5(	222)			
CUG	35.4(	1436)	CCG 18.7(	759)	CAG 28.4(	1152)	CGG	6.1(	248)			
100	7.5(	305)	ACU 9.9(	403)	AAU 5.6(	229)	AGU	6.7(	272)			
AUC	30.9(	1255)	ACC 24.2(	983)	AAC 36.8(	1492)	AGC 2	25.2(	1021)			
AUA	0.9(	36)	ACA 5.3(	215)	AAA 5.6(	228)	AGA	2.6(	107)			
AUG	24.4(	989)	ACG 38.0(	1543)	AAG 40.4(	1638)	AGG	3.4(	137)			
SUU	6.7(	271)	GCU 20.1(	815)	GAU 10.0(	407)	GGU :	11.2(	454)			
GUC	23.4(	948)	GCC 44.6(	1810)	GAC 47.3(	1918)	GGC 3	38.5(	1562)			
GUA	2.8(	114)	GCA 9.6(	389)	GAA 11.6(	471)	GGA	8.9(	360)			
GUG	33.5(	1360)	GCG 29.7(	1207)	GAG 42.9(	1740)	GGG	6.9(	281)			

Tabela 14. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína de *P. sojae* homóloga à *dnj-16*.

Phy	hytophthora sojae hypothetical protein partial mRNA (1100 codons)												
fiel	ds: [trip	let] [fre	quency: per t	thousa	nd] (	[number	])						
UUU	11.8(	13)	UCU 9.1(	10)	UAU	6.4(	7)	UGU 3.6(	4)				
UUC	39.1(	43)	UCC 18.2(	20)	UAC	22.7(	25)	UGC 16.4(	18)				
UUA	3.6(	4)	UCA 5.5(	6)	UAA	0.0(	0)	UGA 0.9(	1)				
UUG	15.5(	17)	UCG 15.5(	17)	UAG	0.0(	0)	UGG 8.2(	9)				
CUU	10.9(	12)	CCU 5.5(	6)	CAU	10.9(	12)	CGU 6.4(	7)				
CUC	26.4(	29)	CCC 8.2(	9)	CAC	12.7(	14)	CGC 15.5(	17)				
CUA	8.2(	9)	CCA 5.5(	6)	CAA	13.6(	15)	CGA 6.4(	7)				
CUG	26.4(	29)	CCG 11.8(	13)	CAG	20.0(	22)	CGG 13.6(	15)				
AUU	24.5(	27)	ACU 7.3(	8)	AAU	14.5(	16)	AGU 10.9(	12)				
AUC	40.0(	44)	ACC 15.5(	17)	AAC	39.1(	43)	AGC 18.2(	20)				
AUA	1.8(	2)	ACA 7.3(	8)	AAA	20.0(	22)	AGA 4.5(	5)				
AUG	23.6(	26)	ACG 24.5(	27)	AAG	31.8(	35)	AGG 4.5(	5)				
GUU	13.6(	15)	GCU 17.3(	19)	GAU	15.5(	17)	GGU 10.0(	11)				
GUC	24.5(	27)	GCC 23.6(	26)	GAC	33.6(	37)	GGC 29.1(	32)				
GUA	5.5(	6)	GCA 17.3(	19)	GAA	30.9(	34)	GGA 10.0(	11)				
GUG	31.8(	35)	GCG 24.5(	27)	GAG	31.8(	35)	GGG 14.5(	16)				

Tabela 15. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína act-1 de *G. max.* 

Phy	hytophthora sojae hypothetical protein mRNA (377 codons)													
field	fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])													
UUU	0.0(	0)	UCU 2.7(	1)	UAU	0.0(	0)	UGU	2.7(	1)				
UUC	31.8(	12)	UCC 15.9(	6)	UAC	39.8(	15)	UGC	13.3(	5)				
UUA	0.0(	0)	UCA 0.0(	0)	UAA	2.7(	1)	UGA	0.0(	0)				
UUG	0.0(	0)	UCG 42.4(	16)	UAG	0.0(	0)	UGG	10.6(	4)				
CUU	2.7(	1)	CCU 0.0(	0)	CAU	0.0(	0)	CGU	21.2(	8)				
CUC	8.0(	3)	CCC 31.8(	12)	CAC	23.9(	9)	CGC	26.5(	10)				
CUA	0.0(	0)	CCA 0.0(	0)	CAA	2.7(	1)	CGA	0.0(	0)				
CUG	63.7(	24)	CCG 18.6(	7)	CAG	23.9(	9)	CGG	0.0(	0)				
AUU	2.7(	1)	ACU 0.0(	0)	AAU	0.0(	0)	AGU	0.0(	0)				
AUC	66.3(	25)	ACC 29.2(	11)	AAC	26.5(	10)	AGC	0.0(	0)				
AUA	0.0(	0)	ACA 0.0(	0)	AAA	0.0(	0)	AGA	0.0(	0)				
AUG	42.4(	16)	ACG 37.1(	14)	AAG	55.7(	21)	AGG	0.0(	0)				
GUU	0.0(	0)	GCU 10.6(	4)	GAU	2.7(	1)	GGU	29.2(	11)				
GUC	26.5(	10)	GCC 53.1(	20)	GAC	61.0(	23)	GGC	45.1(	17)				
GUA	0.0(	0)	GCA 2.7(	1)	GAA	8.0(	3)	GGA	2.7(	1)				
GUG	47.7(	18)	GCG 2.7(	1)	GAG	63.7(	24)	GGG	0.0(	0)				

Tabela 16. Frequência de códons específicos utilizados para a produção dos diferentes aminoácidos da proteína H4 de *G. max.* 

#### H4 [P. sojae] (137 codons)

field	elds: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])											
υυυ	0.0(	0)	UCU	0.0(	0)	UAU	0.0(	0)	UGU	0.0(	0)	
UUC	29.2(	4)	UCC 1	7.3(	1)	UAC	21.9(	3)	UGC	7.3(	1)	
UUA	0.0(	0)	UCA (	0.0	0)	UAA	7.3(	1)	UGA	0.0(	0)	
UUG	0.0(	0)	UCG 29	9.2(	4)	UAG	0.0(	0)	UGG	0.0(	0)	
CUU	0.0(	0)	CCU (	0.0(	0)	CAU	0.0(	0)	CGU	43.8(	6)	
CUC	29.2(	4)	CCC 2	1.9(	3)	CAC	14.6(	2)	CGC	87.6(	12)	
CUA	0.0(	0)	CCA (	0.0(	0)	CAA	0.0(	0)	CGA	0.0(	0)	
CUG	65.7(	9)	CCG 2	1.9(	3)	CAG	58.4(	8)	CGG	0.0(	0)	
AUU	0.0(	0)	ACU (	0.0(	0)	AAU	0.0(	0)	AGU	0.0(	0)	
AUC	51.1(	7)	ACC 4	3.8(	6)	AAC	7.3(	1)	AGC	0.0(	0)	
AUA	0.0(	0)	ACA (	0.0(	0)	AAA	7.3(	1)	AGA	0.0(	0)	
AUG	14.6(	2)	ACG 2	9.2(	4)	AAG	87.6(	12)	AGG	0.0(	0)	
GUU	0.0(	0)	GCU 2:	1.9(	3)	GAU	0.0(	0)	GGU	21.9(	3)	
GUC	21.9(	3)	GCC10	9.5(	15)	GAC	29.2(	4)	GGC	29.2(	4)	
GUA	0.0(	0)	GCA (	0.0(	0)	GAA	0.0(	0)	GGA	7.3(	1)	
GUG	21.9(	3)	GCG	0.0(	0)	GAG	51.1(	7)	GGG	0.0(	0)	

### 8.7. APÊNDICE VII

Conteudo de GC (%) observado em *dnj-16* e nas espécies que estariam envolvidas na TGH que o originou.

Tabela comparativa entre o conteúdo GC (%) do CDS do gene *dnj-16* de *C. elegans* e o valor de "*Coding GC*%" de *C. elegans. G. max, A. thaliana* ou *P. sojae.* "*Coding GC*%" corresponde à porcentagem de GC considerando todas as sequências codificadoras de proteína do genoma completo.

Sequência nucleotídica	GC (%)
dnj-16 (CDS)	41,20%
C. elegans ("coding GC")	42,92%
G. max ("coding GC")	45,95%
A. thaliana ("coding GC")	44,59%
P. sojae ("coding GC")	60,68%

### 8.8. APÊNDICE VIII

#### Constituição (éxons e íntrons) do gene dnj-16

Tabela 1. Informações acerca dos éxons e íntrons das sequências nucleotídicas que codificam as diferentes isoformas (378 aa, 395 aa) do gene *dnj-16*. Fonte: wormbase.

		dnj-16 (378 aa	ı)		dnj-16 (395 aa)								
Éxons	Comprimento	Aminoácidos	Íntrons	Comprimento	Éxons	Comprimento	Aminoácidos	Íntrons	Comprimento				
1°	81 pb	27	1°	154 pb	1°	37 pb	13	1°	270 pb				
2°	223 pb	74	2°	115 pb	2°	95 pb	31	2°	154 pb				
3°	167 pb	55	3°	129 pb	3°	223 pb	74	3°	115 pb				
4°	525 pb	175	4°	62 pb	4°	167 pb	55	4°	129 pb				
5°	141 pb	47			5°	525 pb	175	5°	62 pb				
					6°	141 pb	47						

### 8.9. APÊNDICE IX

Lista de espécies citadas nesse trabalho juntamente com as suas abreviações

Espécie	Abreviação
Achlya hypogyna	Achlya hypogyna
Aegilops tauschii subsp. tauschii	A. tauschii subsp. tauschii
Albugo candida	Albugo candida
Albugo laibachii	A. laibachii
Ananas comosus	A. comosus
Ancylostoma ceylanicum	Ancylostoma ceylanicum
Ancylostoma duodenale	Ancylostoma duodenale
Aphanomyces astaci	Aphanomyces astaci
Aphanomyces invadans	A. invadans
Arabidopsis lyrata	A. lyrata
Arabidopsis thaliana	A. thaliana
Asparagus officinalis	A. officinalis
Brassica napus	B. napus
Brassica oleracea var. oleracea	B. oleracea var. oleracea
Brassica rapa	B. rapa
Brugia malayi	B. malayi
Caenorhabditis brenneri	C. brenneri
Caenorhabditis briggsae	C. briggsae
Caenorhabditis elegans	C. elegans
Caenorhabditis japonica	C. japonica
Caenorhabditis latens	C. latens
Caenorhabditis nigoni	C. nigoni
Caenorhabditis remanei	C. remanei
Caenorhabditis sp.	<i>C. sp.</i>
Cajanus cajan	C. cajan
Caligus rogercresseyi	C. rogercresseyi
Capsicum anuum	C. anuum
Capsicum baccatum	C. baccatum
Capsicum chinense	C. chinense
Chlamydomonas sp	Ch. sp
Cicer arietinum	C. arietinum
Daucus carota	D. carota
Dictyocaulus viviparus	D. viviparus
Diplogaster robustus	D. robustus
Diploscapter pachys	D. pachys

# Tabela 1. Espécies citadas nas diversas análises realizadas nesse trabalho com as suas respectivas abreviações.

*Ectocarpus siliculosus* Escherichia coli Eucalyptus grandis Eutrema salsugineum Glycine max Haemonchus contortus Hevea brasiliensis Hordeum vulgare subsp. vulgare Hypsibius dujardini Ipomoea nil Jatropha curcas Juglans regia Lepeophtheirus salmonis Loa loa Lotus japonicus Lupinus angustifolius Macrostomum lignano Malus domestica Manihot esculenta Medicago truncatula Methanopyrus kandleri Musa acuminata subsp. malaccensis Necator americanus Nelumbo nucifera Nicotiana benthamiana Nicotiana sylvestris Nicotiana tabacum Nicotiana tomentosiformis Oesophagostomum dentatum Onchocerca flexuosa Oryza sativa Panagrolaimus superbus Parastrongyloides trichosuri Phaseolus vulgaris Phytophthora infestans Phytophthora megakarya Phytophthora parasitica Phytophthora sojae Plasmopara halstedii Pristionchus pacificus Proteus vulgaris Prunus avium Prunus mume Prunus persica

E. siliculosus E. coli E. grandis E. salsugineum G. max *H. contortus* H. brasiliensis H. vulgare subsp. vulgare H. dujardini I. nil J. curcas J. regia L. salmonis L. loa L. japonicus L. angustifolius M. lignano M. domestica M. esculenta M. truncatula M. kandleri M. acuminata subsp. malaccensis N. americanus N. nucifera N. benthamiana N. sylvestris N. tabacum N. tomentosiformis O. dentatum O. flexuosa O. sativa P. superbus P. trichosuri P. vulgaris P. infestans P. megakarya P. parasitica P. sojae P. halstedii P. pacificus P. vulgaris P. avium P. mume P. persica

Pseudomonas denitrificans	P. denitrificans
Pyrus × bretschneideri	P. x bretschneideri
Pythium insidiosum	P. insidiosum
Raphanus sativus	R. sativus
Rhabditis coronata	R. coronata
Rhabditis elegans	R. elegans
Rhabditophanes sp.	Rhabditophanes sp.
Rhinolophus sinicus	R. sinicus
Saprolegnia diclina	S. diclina
Saprolegnia parasitica	S. parasitica
Sesamum indicum	S. indicum
Solanum lycopersicum	S. lycopersicum
Solanum pennellii	S. pennellii
Solanum tuberosum	S. tuberosum
Sorghum bicolor	S. bicolor
Spinacia oleracea	S. oleracea
Staphylococcus aureus	S. aureus
Strongyloides papillosus	S. papillosus
Strongyloides ratti	S. ratti
Strongyloides stercoralis	S. stercoralis
Strongyloides venezuelensis	S. venezuelensis
T. Subterraneum	T. subterraneum
Thraustotheca clavata	T. clavata
Toxocara canis	T. canis
Trichinella britovi	T. britovi
Trichinella murrelli	T. murrelli
Trichinella nativa	T. nativa
Trichinella nelsoni	T. nelsoni
Trichinella papuae	T. papuae
Trichinella patagoniensis	T. patagoniensis
Trichinella pseudospiralis	T. pseudospiralis
Trichinella sp.	<i>T. sp.</i>
Trichinella spiralis	T. spiralis
Trichinella zimbabwensis	T. zimbabwensis
Trichuris suis	T. suis
Trifolium subterraneum	T. subterraneum
Turbatrix aceti	T. aceti
Vigna angularis	V. angularis
Vigna radiata	V. radiata
Vitis vinifera	V. vinifera
Wuchereria bancrofti	W. bancrofti

### 8.10. APÊNDICE X

Resultados dos BLASTs realizados para investigar a natureza do primeiro íntron do gene dnj-16 de *C. elegans* 

A princípio, a identidade do primeiro íntron foi analisada por meio de um BLASTn da sua sequência nucleotídica contra oomicetos, o qual resultou em apenas uma pequena sequência homóloga em Phytophthora infestans (Figura 1). Posterirormente, foi realizado outro BLASTn utilizando a sequência do primeiro íntron como isca, mas agora contra o banco de dados de RNA ref-seq de plantas a fim de testar a hipótese de que esse íntron poderia ter se originado a partir da 5'UTR de plantas. Um dos principais hits caiu em uma região codificadora de Arabidopsis lyrata e os outros hits não apresentaram valores relevantes. (Figuras 2 e 3). Além disso, sabe-se que regiões 5'UTR não estão sob forte pressão seletiva tolerando portanto mutações, o que de certa forma tornaria improvável uma grande semelhança com a sequência desse primeiro íntron. Portanto, mesmo que a hipótese de que o primeiro íntron houvesse surgido a partir da região 5'UTR de plantas pudesse ser plausível, as mutações apagariam este rastro.



Se	Sequences producing significant alignments:											
Se	Select: All None Selected:0											
1	Augnments Download <u>GenBank</u> Graphics Distance tree of results		<b>T</b> -1-1	0	-		0					
	Description	score	score	cover	value	Ident	Accession					
	Phytophthora infestans T30-4 cysteine synthase, putative (PITG 22764) mRNA, complete cds	33.7	33.7	10%	1.6	87%	XM 002999221.1					
	Phytophthora sojae hypothetical protein partial mRNA	31.9	31.9	6%	5.6	100%	XM 009523917.1					
	Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 2 mRNA	31.9	31.9	8%	5.6	91%	XM 008908256.1					
	Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 1 mRNA	31.9	31.9	8%	5.6	91%	XM 008908255.1					
	Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein mRNA	31.9	31.9	9%	5.6	88%	XM 008908254.1					
	Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 2 mRNA	31.9	31.9	14%	5.6	79%	XM 008902468.1					
	Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 1 mRNA	31.9	31.9	14%	5.6	79%	XM 008902467.1					
	Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein mRNA	31.9	31.9	14%	5.6	79%	XM 008902466.1					

Figuura 1. Resultado da busca (BLASTn) realizada utilizando a sequência promotora de dnj-16 como isca contra o gênero Phytophthora. As linhas em preto representam

o grau de similaridade com a isca dos resultados produzidos pela busca



#### Select: All None Selected:0

	🕻 Alignments 📳 Download 🍸 <u>GenBank</u> <u>Graphics</u> <u>Distance tree of results</u>						0
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
(	PREDICTED: Cicer arietinum uncharacterized LOC101515225 (LOC101515225), mRNA	42.8	42.8	13%	0.24	89%	XM 004497176.2
(	PREDICTED: Arabidopsis lyrata subsp. lyrata protein ALWAYS EARLY 3 (LOC9319373), transcript variant X4, mRNA	41.0	41.0	9%	0.85	96%	XM 021031567.1
(	PREDICTED: Arabidopsis lyrata subsp. lyrata protein ALWAYS EARLY 3 (LOC9319373), transcript variant X3, mRNA	41.0	41.0	9%	0.85	96%	XM 021031566.1
(	PREDICTED: Arabidopsis lyrata subsp. lyrata protein ALWAYS EARLY 3 (LOC9319373), transcript variant X2, mRNA	41.0	41.0	9%	0.85	96%	XM 021031565.1
(	PREDICTED: Arabidopsis lyrata subsp. lyrata protein ALWAYS EARLY 3 (LOC9319373), transcript variant X1, mRNA	41.0	41.0	9%	0.85	96%	XM 021031564.1
(	PREDICTED: Phoenix dactylifera uncharacterized LOC103711905 (LOC103711905), mRNA	41.0	41.0	13%	0.85	84%	XM 008798223.2
1	PREDICTED: Vigna angularis E3 ubiguitin-protein ligase UPL4 (LOC108326050), transcript variant X3, mRNA	41.0	41.0	16%	0.85	82%	XM 017559294.1
1	PREDICTED: Vigna angularis E3 ubiguitin-protein ligase UPL4 (LOC108326050), transcript variant X1, mRNA	41.0	41.0	16%	0.85	82%	XM 017559292.1
1	PREDICTED: Olea europaea var. sylvestris uncharacterized LOC111393486 (LOC111393486), transcript variant X1, ncRNA	39.2	39.2	9%	3.0	96%	XR 002702429.1

Figura 2. Resultado da busca (BLASTn) usando o primeiro íntron de *dnj-16* (promotor) contra RNA ref-seq de plantas (viridiplantae) a fim de testar a hipótese de **uma origem desse íntron a partir da 5**' UTR de plantas. As linhas em azul e preto representam o grau de similaridade com a isca dos resultados produzidos pela busca

# PREDICTED: Arabidopsis lyrata subsp. lyrata protein ALWAYS EARLY 3 (LOC9319373), transcript variant X4, mRNA

NCBI Reference Sequence: XM\_021031567.1

GenBank FASTA

										Link To This \	View   Feedback
f	200 400	600 800	<u> 1K  1,20</u>	0 <u> </u> 1,400	1,600  1,8	00  2 K	2,200 2,400	2,800	3 K 3,20	0 3,400	3,600 3,894
\$ <b>≥</b> xn	1_021031567.1	- Find:		▼ <	0		( 🕕 🛃		🔀 Tool	• 😤 🗘	Tracks 🥭 🤋 🗸
S50 Sequenc	2,660 e	2,670	2,680	2,690	2,700	2,710	2,720	2,730	2,740	2,750	2,760
AGTTCA TCAAGT	AATCCACAAG TTAGGTGTTC	CTCAAGATGG GAGTTCTACC	AGTCGATGAGGO TCAGCTACTCCO	TCTTGATT AGAACTAA	TACAATTG	AATTAAGA	CAGCCCTCAAGT GTCGGGAGTTCA	TATTGGACATATC	CAGGCAAGAG GTCCGTTCTC	AAGCTGA TTCGACT	TGTCCAAGCTC ACAGGTTCG
Genes						H H					×
>	>	>		>	≻ XP_€	20887226.1 >		>	>		>
AGT TCA	ART CCA CAA G	CT CAA GAT GGA A Q D G	IGTC GAT GAG GO	CTTGATI	TA CAA TTG I	F N S	CAG CCC TCA AGT	ATT GGA CAT ATC	CAG GCA AGA (	SAA GCT GA	T GTC CAA GCT (
BLAST R	esults for:	Nucleotide	Sequence (26	7 letters	) Oueru 1						×
				1 💹			eeee 🌆 241				
650	2,660	2,670	2,680	2,690	2,700	2,710	2,720	2,730	2,740	2,750	2,760
XM_021	031567.1: 2.7K	.2.8K (114bp)								🕺 🏟 Tra	acks shown: 3/4

Figura 3. Sequência nucleotídica de Arabidopsis lyrata (XM\_021031567.1) homóloga ao primeiro íntron de dnj-16.

### 8.11. APÊNDICE XI

Análise dos sítios de terminação presentes na região do primeiro íntron do gene *dnj-16* realizada como controle da análise similar realizada na 3´UTR de *dnj-16*.

A

AGATTTATAA<mark>TTGTTI</mark>AATTCTCAGCAA<u>TTAATT</u>TCCATGAGCAGCGAACGACTAATTGTCAAAATTGAG CG<mark>TGTTTT</mark>ATATTGATTCTGTCTCTGTGCTATTCCATCTTTCCTGCCTAAAATGTATGGCTTTCTCGTGCTTAC ATTTCTCCAATACTTTCCAAAGAGACGCAGACATAAACGA<mark>ATGTTI</mark>GCCCTATTGCGAAAGAAGTAAAT GAATCACCCTTCCTTTTCCCTTTTCCC

#### B

AGATTTATAATTGTTTAATTCTCAGCAA<u>TTAATT</u>TCCATGAGCAGCGAACGACTAATTGTCAAAATTGAG C<mark>GTGTTTT</mark>ATATTGATTCTGTCTCTGTGCTATTCCATCTTTCCTGCCTAAAATGTATGGCTTTTCTCGTTAC ATTTCTCCAATACTTTCCAAAGAGACGCAGACATAAACGAATGTTTGCCCTATTGCGAAAGAAGTAAAT GAATCACCCTTCCTTTTTCCCCTTTTTTCCAC<mark>TATTTTTATTTTTATTTTTTG</mark>AAG

**Figura 1. A**. Sítios de terminação (elementos de clivagem (vermelho); elementos *cis* para a poliadenilação do mRNA (cinza); sítio rico em "GU" típico de mamíferos (azul)) **B**. Modelo sintético da região promotora de *dnj-16*.

### 8.12. APÊNDICE XII

Análises da viabilidade de *Nicotiana benthamiana* e *Drosophila melanogaster* após exposição a 400.000 x *g* por 1 h

#### **1. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 1.1. Manutenção

#### 1.1.1. Sementes

As sementes de *Nicotiana benthamiana* foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Helena Goldman de Souza e foram armazenadas em temperatura ambiente. Após os tratamentos elas foram inseridas em substrato de planta (Bioplant) hidratado.

#### 1.1.2. Moscas

As populações de *Drosophila melanogaster* foram mantidas em meio de cultura a base de milho e um total de 10 larvas foram utilizadas em cada experimento. A fim de se obter larvas sincronizadas, 30 casais foram inseridos em frascos de cultivo e após 12 horas eles foram retirados e descartados. Os ovos ovipostos nesse período foram monitorados e apenas larvas do 3° instar foram utilizadas nos experimentos.

#### **1.2. Procedimento experimental**

#### 1.2.1. Drosophila melanogaster

Larvas do 3° instar de *Drosophila melanogaster* foram cuidadosamente retiradas das garrafas de cultivo antes de formarem pupas e inseridas em tubos de ultracentrifugação. Foram analisadas 10 larvas para cada um dos grupos (CN1, CN2, GE). As condições experimentais de cada um destes grupos são exatamente as mesmas indicadas para *C. elegans*.

Logo após o estresse de força g as larvas de cada um dos grupos experimentais foram inseridas em uma garrafa contendo meio de cultura e o desenvolvimento (20°C; 12h claro/12h escuro) delas foi monitorado ao longo de uma semana. As que conseguiram formar pupa, eclodir e dar origem ao imago foram consideradas como viáveis.

#### 1.2.2. Nicotiana Benthamiana

Trinta sementes secas de *Nicotiana Benthamiana* foram utilizadas em cada um dos três grupos (CN; CN2; GE) analisados no experimento. As condições experimentais de cada um destes grupos são exatamente as mesmas indicadas para *C. elegans*.

Após a semeadura, os recipientes contendo as sementes foram expostos à temperatura de 4°C durante dois dias a fim de sincronizar o crescimento das plantas (AKARI et al. 2014) e apenas posteriormente foram transferidos para a estufa a 30°C. As sementes foram semeadas em substrato para plantas e deixadas em estufa a 30°C para crescer durante duas semanas. O número de plântulas em cada um dos recipientes foi contado ao final da 2ª semana.

#### 1.3. Análise estatística

Cada experimento foi composto por triplicatas biológicas, sendo cada replicata biológica composta por 10 indivíduos (sementes ou larvas) em cada grupo.

Os dados foram analisados usando os testes foram analisados usando os testes "One Way ANOVA" seguido de Student Newman, tendo como corte p<0,05.

#### 2. RESULTADOS

#### 2.1. Drosophila melanogaster

Os resultados da análise de viabilidade apontaram para a letalidade da condição de 400.000 x g para larvas do 3° instar de *Drosophila*. Não foi observada diferença significativa entre o CN1 e o CN2 (Figura 1). A análise das fotos das larvas do 3° instar de *Drosophila* após a exposição a 400.000 x g demonstrou que apesar de inviáveis elas não apresentaram alterações morfológicas drásticas (Figura 2).

#### 2.2. Nicotiana benthamiana

Os resultados demonstraram que a centrifugação a 400.000 x g não foi capaz de afetar drasticamente a morfologia (Figura 3-4) viabilidade (Figura 5-6) e a das sementes de *Nicotiana benthamiana*. Apesar de ter sido observada uma redução significativa da viabilidade das sementes após a exposição à ultracentrifugação (Figura 6).



**Figura 1. Viabilidade das larvas após a exposição a diferentes condições experimentais.** CN1: larvas a temperatura ambiente (~20°C) não centrifugadas; CN2: larvas a 4°C não centrifugadas; GE: larvas a 4°C centrifugadas (400.000 x g por 1h). Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas. N° de larvas do 3° instar por tratamento: 30 (*i.e.*, 3 replicatas biológicas, cada qual com 10 indivíduos por tratamento). (\*) diferença estatística (p<0.05).



Figura 2. Imagens das larvas (3° instar) dos diferentes grupos após a exposição às diferentes condições experimentais. A. CN1: larvas a temperatura ambiente (~20°C) não centrifugadas; B. CN2: larvas a 4°C não centrifugadas; C, GE: larvas a 4°C centrifugadas (400.000 x g por 1h). N° de larvas por tratamento: 30 (*i.e.*, 3 replicatas biológicas, cada qual com 10 indivíduos por tratamento). (\*) diferença estatística (p<0.05).



Figura 3. Imagens das sementes obtidas após a exposição às diferentes condições experimentais. A. CN1: sementes a temperatura ambiente ( $\sim 20^{\circ}$ C) não centrifugadas; B. CN2: sementes a 4°C não centrifugadas; C. GE: sementes a 4°C centrifugadas (400.000 x g por 1h). 12 sementes foram analisadas em cada um dos grupos. A análise foi feita por meio do estereomicroscópio Discovery V20.



Figura 4. Imagens das sementes de *Nicotiana benthamiana* após a exposição às diferentes condições experimentais. A. CN1: sementes a temperatura ambiente ( $\sim 20^{\circ}$ C) não centrifugadas; B. CN2: sementes a 4°C não centrifugadas; C. GE: sementes a 4°C centrifugadas (400.000 x g por 1h). 12 sementes foram analisadas em cada um dos grupos. A análise foi feita por meio do estereomicroscópio Discovery V20.



Figura 5. Plântulas de *Nicotiana benthamiana* obtidas duas semanas após a exposição às diferentes condições experimentais. A. CN1: sementes a temperatura ambiente ( $\sim 20^{\circ}$ C) não centrifugadas; B. CN2: sementes a 4°C não centrifugadas; C. GE: sementes a 4°C centrifugadas (400.000 x g por 1h). Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas. 30 sementes foram utilizadas por um dos tratamentos.



Figura 6. Porcentagem de sementes que germinaram após a exposição às diferentes condições experimentais. CN1: sementes a temperatura ambiente (20°C) não centrifugadas; B. CN2: sementes a 4°C não centrifugadas; C. GE: sementes a 4°C centrifugadas (400.000 x g por 1h). Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas. 30 sementes foram utilizadas para cada um dos tratamentos. (\*) diferença estatística (p<0.05).

#### 3. DISCUSSÃO

#### 3.1. Drosophila melanogaster

A análise do desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* em condições de hipergravidade está bem documentada na literatura (HILL et al., 2012; LE BOURG, 1999; 2005; 2007; 2011; 2012; 2015; LE BOURG; MINOIS, 1999; LE BOURG, MASSOU, GOBERT, 1999; MINOIS; BOURG, 1999; MINOIS et al. 1999). No entanto, praticamente todos esses estudos tem focado na faixa de 2 a 5 x g, a qual demonstrou ter efeitos horméticos, aumentando a longevidade e a resistência a diversos tipos de estresse nesses dípteros.

Dessa forma, até onde sabemos, esse foi o primeiro trabalho a expor esse organismo a  $10^5$  x g. Apesar das larvas não resistirem a esse estresse (Figura 1), foi observado que elas não se desintegraram, sendo observados movimentos corporais discretos logo após a centrifugação (Figura 2). Essas observações são um indicativo de que provavelmente as larvas do 3° instar de *Drosophila melanogaster* tenham tolerância a um valor de hipergravidade bem superior a  $10^1$  x g.

#### 3.2. Nicotiana benthamiana

A resposta à hipo- e hipergravidade está bem caracterizada em plantas, sendo que alguns estudos verificaram que suas sementes são capazes de resistir a  $10^5 \times g$  (BEAMS; KING, 1935; KWON; OONO, 1992). Considerando que *Nicotiana benthamiana* é uma planta amplamente utilizada em estudos de interação planta/patógeno (GOODIN et al. 2008), a constatação que suas sementes também são resistentes a  $10^5 \times g$  (Figura 6) a credencia como um modelo para estudos no espectro de hipergravidade.

#### 4. REFERÊNCIAS

AKARI, T., FUMI, A., TOMOHIRO, K., TAKEHITO, I. Production of viable seeds from the seedling lethal mutant ppi2-2 lacking the atToc159 chloroplast protein import receptor using plastic containers, and characterization of the homozygous mutant progeny. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 243, 2014.

BEAMS, H. W.; KING, R. L. The effects of ultracentrifuging on the cells of the root tip of the bean, **Nature**, v. 135, p. 232, 1935.

GOODIN, M. M.; ZAITLIN, D.; NAIDU, R. A.; LOMMEL, S. A. Nicotiana benthamiana: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 21, n. 8, p. 1015-26, 2008.

HILL, RJ, LARKIN OJ, DIJKSTRA CE, MANZANO AI, DE JUAN E, DAVEY MR, ANTHONY P, EAVES L, MEDINA FJ, MARCO R, HERRANZ R. Effect of magnetically simulated zero-

gravity and enhanced gravity on the walk of the common fruitfly. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, n. 72, p. 1438-49, 2012.

KWON, S. T., OONO, K. Gravity responsible protein and mRNA related to the survival of rice (*Orysa sativa L.*) from gravity stress. **The Japanese Journal of Genetics**, v. 67, n. 4, p. 321-334, 1992.

LE BOURG, E. A review of the effects of microgravity and of hypergravity on aging and longevity. **Experimental Gerontology**, v.34, p. 319 -336,1999.

LE BOURG, E. Hormetic protection of *Drosophila melanogaster* middle-aged male flies from heat stress by mildly stressing them at young age. **Naturwissenschaften**, v. 92, n. 6, p. 293-6, 2005

LE BOURG, E. Hormetic effects of repeated exposures to cold at young age on longevity, aging and resistance to heat or cold shocks in *Drosophila melanogaster*. **Biogerontology**, v. 8, p. 431-444, 2007.

LE BOURG, E. Using *Drosophila melanogaster* to study the positive effects of mild stress on aging. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 5, p. 345-8. 2011

LE BOURG, E. Combined effects of two mild stresses (cold and hypergravity) on longevity, behavioral aging, and resistance to severe stresses in *Drosophila melanogaster*. **Biogerontology**, v.13, p. 313–328, 2012.

LE BOURG, E. Fasting and other mild stresses with hormetic effects in *Drosophila melanogaster* can additively increase resistance to cold. **Biogerontology**, v.16, p. 517-527, 2015.

LE BOURG, E.; MASSOU, I.; GOBERT, V. Cold stress increases resistance to fungal infection throughout life in *Drosophila melanogaster*. **Biogerontology**, v. 10, n. 5, p. 613-25. 2009.

LE BOURG, E.; MINOIS, N. A mild stress, hypergravity exposure, postpones behavioral aging in *Drosophila melanogaster*. Experimental Gerontology, v. 34, n. 2, p.157-72, 1999.

MINOIS, N.; LE BOURG, E. Resistance to stress as a function of age in Drosophila melanogaster living in hypergravity. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.109, n. 1, p. 53-64, 1999.

MINOIS, N.; GUINAUDY, M. J.; PAYRE, F.; LE, BOURG, E. HSP70 induction may explain the long-lasting resistance to heat of *Drosophila melanogaster* having lived in hypergravity. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 109, n. 1, p. 65-77, 1999.

### 8.13. APÊNDICE XIII

Análise da região promotora do gene dnj-16 de C. elegans



**Figura 1 A-B. Resultado da busca (BLASTn) utilizando a sequência do primeiro íntron de** *dnj-16* **como isca.** As linhas em azul representam o grau de similaridade dos resultados produzidos pela busca comparativamente à isca (A). Os primeiros 15 hits gerados a partir dessa busca estão representados na imagem.

			Color	key for align	ment scores	5							
		<40	40-50	50-80	80-2	200	>=200						
			L.	Quer	<b>v</b>	1							
		1	50	100	150	200	250						
						_	-						
				_									
				_									
								J					
ris	tions												
Soo	uonces produzina significant alignmente:												
orq	at 10 Mars Only de the												
100	CT ALLNODE SELECTEDU												
11	ct: <u>All None</u> Selected.0 Alignments Download - GenBank Graphics Distance.tree	e of results											0
11	Ct <u>All None</u> Selected.0 Alignments Download <u>GenBank Graphics Distance Irec</u>	e of results	Description					Max score	Total score	Query	E value	Ident	Accession
11	Ct All None Selected.0 Alignments Download - GenBank Graphics Distance Ired Phylophthora infestans T30-4 cysteine synthase, putative (PITG 22764	e of results ( 4) mRNA, comple	Description					Max score 33.7	Total score 33.7	Query cover 10%	E value 1.6	Ident 87%	C Accession XM 002999221.1
	Ct. <u>All None</u> Selected.0 Alignments Download GenBank Graphics Distance Irec <u>Phylophthora infestans T30-4 cysteine synthase, putative (PITG, 22764</u> <u>Phylophthora solae hypothetical protein partial mRNA</u>	e of results ( 4) mRNA, comple	Description ete cds					Max score 33.7 31.9	Total score 33.7 31.9	Query cover 10% 6%	E value 1.6 5.6	Ident 87% 100%	C Accession XM 002999221.1 XM 009523917.1
	CC All NODE Selected.0 Alignments Download × GenBank Graphics Distance Ires Phytophthora infestans T30-4 cysteine synthase, putative (PITG: 22764 Phytophthora solae hypothetical protein partial mRNA Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 2 mRNA	e of results ( 4) mRNA, comple à	Description ete.cds					Max score 33.7 31.9 31.9	Total score 33.7 31.9 31.9	Query cover 10% 6% 8%	E value 1.6 5.6 5.6	Ident 87% 100% 91%	Accession XM 0029992211 XM 009523917.1 XM 000908256.1
	Ct. All None Selected.0 Alignments Download - GenBank Graphics Distance Ires Phytophthora infestans T30-4 cysteine synthase, putative (PITG: 22764 Phytophthora solae hypothetical protein partial mRNA Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 2 mRNA Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 1 mRNA	e of results ( 4) mRNA, compl A	Description ete ods					Max score 33.7 31.9 31.9 31.9	Total score 33.7 31.9 31.9 31.9	Query cover 10% 6% 8%	E value 1.6 5.6 5.6 5.6	Ident 87% 100% 91% 91%	C Accession XM 002999221.1 XM 0099922917.1 XM 000908256.1 XM 000908255.1
	CC All NODE Selected 0 Alignments Download - GenBank Graphics Distance Ires Phytophthora infestans T30-4 cysteine synthase, putative (PITG: 22764 Phytophthora solae hypothetical protein partial mRNA Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 2 mRNA Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 1 mRNA Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 1 mRNA	e of results ( 4) mRNA, compl à à	Description etc.cds					Max score 33.7 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9	Total score 33.7 31.9 31.9 31.9 31.9	Query cover 10% 6% 8% 8% 9%	E value 1.6 5.6 5.6 5.6 5.6	Ident 87% 100% 91% 88%	Accession XM 002999221.1 XM 009523917.1 XM 000908256.1 XM 000908255.1 XM 000908254.1
	Ct. All NODE Selected.0  Alignments Download - GenBank Graphics Distance Iree  Phylophthora infestans T30-4 cysteine synthase, putative (PITG: 22764 Phylophthora solae hypothetical protein partial mRNA Phylophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 2 mRNA Phylophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 1 mRNA Phylophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein mRNA Phylophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein mRNA Phylophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein mRNA	e of results ( 4) mRNA, compl à à	Description ete cds					Max score 33.7 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9	Total score 33.7 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9	Query cover 10% 6% 8% 9% 14%	E value 1.6 5.6 5.6 5.6 5.6 5.6	Ident 87% 100% 91% 88% 79%	C Accession XM_002999221.1 XM_009992256.1 XM_008908255.1 XM_008908255.1 XM_008908255.1 XM_008908256.1
	CC All NORE Selected 0 Alignments Download × GenBank Graphics Distance Ired Phytophthora infestans T30-4 cysteine synthase, putative (PITG: 22764 Phytophthora solae hypothetical protein partial mRNA Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 2 mRNA Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 1 mRNA Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 1 mRNA Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 2 mRNA Phytophthora parasitica INRA-310 hypothetical protein, variant 2 mRNA	e of results ( 4) mRNA, compl à à à	Description ete cds					Max score 33.7 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9	Total score 33.7 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9 31.9	Query cover 10% 6% 8% 8% 9% 14%	E value 1.6 5.6 5.6 5.6 5.6 5.6 5.6	Ident 87% 100% 91% 88% 79%	Accession XM 002999221.1 XM 009523917.1 XM 008908256.1 XM 008908255.1 XM 008908254.1 XM 008908254.1 XM 008902468.1 XM 008902467.1

Figura 2. Resultado da busca (BLASTn) realizada utilizando a sequência do primeiro íntron de *dnj-16* como isca contra o gênero *Phytophthora*. As linhas em preto representam o grau de similaridade dos resultados produzidos pela busca comparativamente à isca.

### 8.14. APÊNDICE XIV

Análise da região de terminação do gene dnj-16 de C. elegans



**Figura 1. Resultado da busca (BLASTn) realizado utilizando como isca a sequência intergênica entre** *dnj-16* e *xbp-1*. As linhas em verde e azul representam o grau de similaridade dos resultados produzidos pela busca comparativamente à isca.

### 8.15. APÊNDICE XV

#### Busca por organismos que poderiam mediar uma TGH via RNA entre plantas e oomicetos

Como a TGH entre *P. infestans* e *C. elegans* provavelmente tenha ocorrido via RNA, foram realizados algumas buscas (BLASTs) para tentar encontrar algum potencial vírus que teria mediado o processo de TGH via RNA (que envolveria interações de bases DNA/RNA). No entanto, o BLASTn usando como isca o mRNA (CDS) de *dnj-16* (378) contra "viridae", "retroviridae" e "retro-transcribing viruses", conjuntamente não identificou nenhum sinal significativo. Já o tBLASTn realizado apenas contra "viridae" resultou em alguns *hits* interessantes. Além disso, o BLASTn usando o mRNA (CDS) de *dnj-16* (378) contra "transposon" não identificou nenhum sinal significativo.

				Color	r key for	alignmen	t scores						
		<40		40-50	5	0-80	80-200	>=20	00				
		1	200		400	Query 600	800	1000	)				
		-	=	Ξ	_		-	-					
				=									
crip	ptions												
Sea	quences producing s	significant alignmer	nts:										
Seq	quences producing s	significant alignme	nts:										
Sele	quences producing s lect: <u>All None</u> Selec Alignments <b>B</b> Down	s <b>ignificant alignme</b> r sted:0 nload <u>GenBank</u>	nts:	Distance	e tree of res	sults							
Sele	quences producing s ect: <u>All None</u> Selec Alignments 📳Dowr	s <b>ignificant alignme</b> r sted:0 nload <u>GenBank</u>	nts: Graphics	Distance	e tree of res	<u>sults</u>		Мах	Total	Query	E	Ident	Accessi
Sele	quences producing s lect: <u>All None</u> Selec Alignments 📳Down	s <b>ignificant alignmer</b> ≿ted:0 hload <u>∽ GenBank</u>	nts: Graphics Desc	Distance	e tree of res	<u>sults</u>		Max score	Total score	Query	E value	Ident	Accessio
Sele	quences producing s lect: <u>All None</u> Selec Alignments Down	significant alignmer sted:0 bload <u>v GenBank</u> strain 630 delta erm, o	nts: Graphics Desc	Distance cription	e tree of res	<u>sults</u>		Max score 44.6	Total score 44.6	Query cover 5%	E value 0.16	Ident 77%	Accession CP016318
Sele	quences producing s lect: <u>All None</u> Selec Alignments Down <u>Clostridioides difficile</u> <u>Clostridioides difficile</u>	significant alignmer sted:0 hload v GenBank strain 630 delta erm, o 630, complete genom	nts: Graphics Desc complete ger	Distance cription nome	e tree of res	<u>sults</u>		Max score 44.6 44.6	Total score 44.6 44.6	Query cover 5% 5%	E value 0.16 0.16	Ident 77% 77%	Accessio <u>CP016318</u> <u>CP010905</u>
Sele	quences producing s lect: <u>All None</u> Selec Alignments Down <u>Clostridioides difficile</u> <u>Clostridioides difficile</u> <u>Bacillus anthracis str.</u>	significant alignmen sted:0 hload <u>GenBank</u> strain 630 delta erm, o 630, complete genom Ames, complete genom	nts: Graphics Desc complete ger ne ome	Distance cription nome	e tree of res	<u>sults</u>		Max score 44.6 44.6 42.8	Total score 44.6 44.6 42.8	Query cover 5% 5% 4%	E value 0.16 0.16 0.56	Ident 77% 77%	Accessic <u>CP016318</u> <u>CP010905</u> <u>AE016879</u>
Sele	quences producing s lect: <u>All None</u> Select Alignments Down <u>Clostridioides difficile</u> <u>Clostridioides difficile</u> <u>Bacillus anthracis str.</u> <u>Bacillus cereus ATCC</u>	significant alignmer ted:0 load <u>GenBank</u> strain 630 delta erm, o 630, complete genom Ames, complete genom 14579, complete gen	nts: Graphics Desc complete ger ne pome nome	Distance cription nome	e tree of res	<u>sults</u>		Max score 44.6 44.6 42.8 42.8	Total score 44.6 42.8 42.8	Query cover 5% 5% 4% 4%	E value 0.16 0.56 0.56	Ident 77% 77% 79% 79%	Accessio <u>CP016318</u> <u>CP010905</u> <u>AE016879</u> <u>AE016877</u>
Sele	quences producing s lect: <u>All None</u> Select Alignments Down <u>Clostridioides difficile</u> <u>Clostridioides difficile</u> Bacillus anthracis str. <u>Bacillus cereus ATCC</u> <u>Staphylococcus aureu</u>	significant alignmen ted:0 load <u>GenBank</u> strain 630 delta erm, o 630, complete genom Ames, complete genom 14579, complete geno 14579, complete geno	nts: Graphics Desc complete ger ne nome nome e genome	Distance cription nome	e tree of res	<u>sults</u>		Max score 44.6 44.6 42.8 42.8 42.8 41.0	Total score 44.6 42.8 42.8 80.1	Query cover 5% 5% 4% 4% 14%	E value 0.16 0.56 0.56 2.0	Ident 77% 77% 79% 79% 68%	Accessio <u>CP016318</u> <u>CP010905</u> <u>AE016877</u> <u>CP001844</u>

Figura 1. Resultado da busca (BLASTn) utilizando o mRNA (CDS) de *dnj-16* (378 aa) contra ("viridae", "retroviridae" e "retro-transcribing viruses", todos conjuntamente). As linhas em azul e preto representam o grau de similaridade dos resultados produzidos pela busca comparativamente à isca.



**Figura 2. Resultado da busca (tBLASTn) utilizando como isca a proteína dnj-16 (378 aa) contra "viridae".** As linhas em rosa, verde e azul representam o grau de similaridade dos resultados produzidos pela busca comparativamente à isca.



Figura 3. Resultado da busca (BLASTn) utilizando como isca o CDS de *dnj-16* (378 aa) contra "transposons". As linhas em preto representam o grau de similaridade dos resultados produzidos pela busca comparativamente à isca

### 8.16. APÊNDICE XVI

## Artigo 'Caenorhabditis elegans tolerates hyperaccelerations up to 400,000 x g" submetido para o periódico "Astrobiology"



Astrobiology Manuscript Central: http://mc.manuscriptcentral.com/astrobiology

#### Caenorhabditis elegans tolerates hyperaccelerations up to 400,000 x g

Journal:	Astrobiology
Manuscript ID	AST-2017-1802
Manuscript Type:	Rapid Communications
Date Submitted by the Author:	05-Dec-2017
Complete List of Authors:	Souza, Tiago; Universidade de Sao Paulo Campus de Ribeirao Preto, Genética; Universidade de Sao Paulo Campus de Ribeirao Preto, Biologia Pereira, Tiago; Universidade de Sao
Keyword:	Gravity, Lithopanspermia, Panspermia, Astrobiology
Manuscript Keywords (Search Terms):	<i>Caenorhabditis elegans</i> , Hypergravity, Ultracentrifugation, Acceleration, Panspermia, Astrobiology
	·

#### Title: Caenorhabditis elegans tolerates hyperaccelerations

### up to 400,000 x g

#### Running title: C. elegans tolerates 400,000 x g

Tiago Alves Jorge de Souza<sup>1,2</sup>; Tiago Campos Pereira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Genetics, FMRP, University of São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Department of Biology, FFCLRP, University of São Paulo, Brazil

#### Abstract

Some model organisms have a short life cycle, are easy to maintain and breed in a laboratory. Among these organisms, the nematode *Caenorhabditis elegans* stands out. Since its standardization as a model organism by Sidney Brenner, this nematode has been used in a range of research fields such as neurobiology, development and molecular biology. The scientific progress obtained by employing *C. elegans* as a model in these areas has encouraged its use in new research fields. One of the new potential applications concerns the biological responses to hyperacceleartion stress (*g*-force). In this context, few studies have evaluated the response of multicellular organisms to extreme hypergravity conditions at  $10^5 \times g$  magnitude order. Therefore, we submitted the nematode *C. elegans* to 400,000 x g and evaluated the viability, body structure as well as the behavior after the exposure to this stress. The metabolic activity of this worm in response to the gravitational spectrum of 50 to 400,000 x g was also evaluated by means of the MTT assay. Surprisingly, we found that this organism shows no decrease in viability, changes in behavior and development neither drastic metabolic depression due to the exposure to this stress. Thus, we demonstrated for the first time that this multicellular research model can withstand extremely high g-forces, which prompts the use of *C. elegans* as a new model for astrobiology.

Key words: C. elegans, hipergravity, ultracentrifugation, MTT, astrobiology. Introduction

The model nematode *C. elegans* was isolated and described along with other worms by the french zoologist Émile Maupas in the transition to the XX century (Maupas, 1899, 1900). The easy laboratory maintenance of *C. elegans* added to its morphological and physiological peculiarities has rendered this species an excellent model organism for different research fields such as neurobiology, development and apoptosis. The efficiency of using this model to uncover biological processes can be exemplified by the elucidation of the apoptosis mechanism, the discovery of RNA interference (RNAi) mechanism and the characterization of GFP protein as a biological marker. All these scientific advances were awarded with Nobel Prizes in 2002, 2006 and 2008, respectively (Chalfie, 2009; Fire *et al.*, 1998; Möller, 2002).

Among the most recent applications of *C. elegans* as a model organism is the study of anhydrobiosis, *i.e.*, the tolerance to extreme desiccation regimes (Erkut *et al.*, 2011, 2013). In addition, *C. elegans* displays tolerance to other types of stress such as radiation (Onodera *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2016) and low temperatures (Ujisawa *et al.*, 2014). The life resilience to abiotic stresses such as extremes of temperatures, radiation and gravitacional conditions is of great interest to astrobiology, *i.e.*, the study of life in the universe (Allen, 2001). In this context, studies of the physiological effects caused by variations in gravitational forces have also employed *C. elegans* as a model (Gao *et al.*, 2015; Honda *et al.*, 2012, 2014; Johnson and Nelson, 1991). The exposure of this organism to hypogravity conditions, for example, has been used to understand the physiological and metabolic changes that occur in astronauts in outer space (Clark, 2015).

Furthermore, *C. elegans* has also been used as a model to understand the effects of hypergravity on genetic and physiological processes (Kalichamy *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2007, Qian *et al.*, 2013, Saldanha *et al.*, 2016; Sasagawa *et al.*, 2003). However, the values of hypergravity tested to date did not exceed 1,6 x  $10^3$  x g (Johnson and Nelson, 1991), which is much lower than the hypergravity conditions to which a hypothetical organism would be exposed during ballistic and lithopanspermia scenarios. The ballistic panspermia, also known as interplanetary panspermia, argues that rocks expelled from planet's surface would serve as transfer vehicles for spreading life between planets within a solar system. On the other hand, lithopanspermia idea is more comprehensive and deals with the possibilities of life's communication between two bodies (*e.g.* Mars to Earth) (Burchell, 2004). In this context, by means of mathematical calculations, Melosh (1993) estimated that the hyperacceleration conditions to which an organism would be exposed in these scenarios would be on the order of  $10^5$  x g. Thanks to Ernest Mach and Albert Einstein studies, we know that acceleration and gravity are equivalent forces in living organisms (Halliday *et al.*, 1993, Russomano *et al.*, 2007). Thereunto, studies focused on understanding the response of

life to hypergravity can take direct advantage of the use ultracentrifugation to simulate such conditions.

During the first decades of the twentieth century, high performance ultracentrifuges were developed making it possible the exposure of diverse organisms to accelerations up to  $10^5 \text{ x } g$ . Recent studies, for example, demonstrated that bacteria *Pseudomonas denitrificans* and *E. coli* and the algae *Chlamydomonas sp* can withstand conditions of 403,627 and 670,000 x g, respectively (Deguchi *et al.*, 2011, Gao *et al.*, 2013). However, these reports were limited to the analysis of unicellular organisms and unfortunately there is only a limited number of studies which evaluated the response of other living organisms to the extreme conditions of hypergravity. Thus, the present work evaluated the exposure of *C. elegans* to 400,000 x g and the effects on the viability, behavior, development and metabolism, thus contributing to elucidate the response of *C. elegans* as a model organism for studies in astrobiology.

#### 2. Material and Methods

#### 2.1. Nematode maintenance

*Caenorhabditis elegans*, kindly provided by Prof. Alan Tunnacliffe (University of Cambridge, UK), was maintained in the dark, at 20 °C, on NGM (Nematode Growth Medium) agar plates and fed with a layer of *Escherichia coli* (OP50 strain). Mixed populations, composed of all life cycle stages, were used in viability and behavioral analyses and synchronized L2 larvae populations were used in developmental and metabolic analyses.

#### 2.2. Viability assay

Initially, NGM agar plates were rinsed with M9 buffer in order to dislodge and collect worms, which were subsequently washed three times with M9 buffer to remove excess of *E. coli* bacteria. Worms were then submitted to ultracentrifugation as described below. Thereafter, we performed survival assay using a modified version of a protocol, which has been used for isolated cells (Krause *et al.*, 1984) and has already been successfully used for another nematode species (Souza *et al.*, 2017). Briefly, the supernatant was removed and erythrosin B dye was added (0.4 % w/v in M9 buffer). After 1 h, samples were washed three times with M9 buffer to remove excess of dye. Dead worms stained in pink, live worms remained unstained.

#### 2.3. Synchronization

Maintenance of *C. elegans* on agar NGM plates naturally generates mixed populations, *i.e.*, containing eggs, L1, L2, L3, L4 larvae and adult individuals. Performing controlled experiments demand homogeneous populations. Therefore, mixed populations of *C. elegans* were submitted to the synchronization process via bleaching for the developmental and MTT experiments. Briefly, mixed populations were exposed to a bleaching solution (NaOH 1%; NaClO 30%) for 10 min, which disintegrates worms, leaving only eggs. After this period three washes were performed with distilled water intercalated with centrifugations at 2,000 x g for 30s. The eggs were deposited on agar NGM plates containing OP50 bacteria and were maintained in the dark, at 20 °C. After 14 h, plates were rinsed with M9 buffer to dislodge and collect L2 larvae, which were used in developmental and MTT experiments.

#### 2.4. Experimental Groups

The experiments were carried out considering three groups: Negative Control 1 (NC1), Negative Control 2 (NC2) and Experimental Group (EG). NC1 was composed of worms not subjected to centrifugation and maintained at 20°C for 1 h. NC2 was composed of non-centrifuged worms maintained at 4°C for 1 h. EG was composed of worms centrifuged at 400,000 × g for 1 h at 4°C. In the MTT experiment, the EG group also included other hyperacceleration conditions (*i.e.*, 50; 100; 1,000; 10,000 or 100,000 x g) for 1 h at 4°C.

#### 2.5. Hypergravity assays

Conditions of high *g*-force (hypergravity) were achieved by centrifugation at 4°C for 1 hour. The tests were performed on Eppendorf centrifuges models: 5417R (50 and 1,000 x *g*); 5415R (100 x *g*) and 5403 (10,000 x *g*), all from Department of Biology, FFCLRP/USP. Centrifugation at 100,000 and 400,000 x *g* were performed in the Optima MAX-XP high-performance ultracentrifuge - Beckman Coulter (Department of Biochemistry, FMRP USP). After insertion of the samples into the ultracentrifuge the vacuum was switched on and centrifugation started only when ideal conditions were reached (1.34 Pascal inside the centrifuge chamber).

#### 2.6. Morphological and behavioral analyses
*C. elegans* worms were centrifuged at  $400,000 \times g$  at 4°C for 1h and the morphology and behavior were analyzed within 60 min after the experiment. Images and videos were generated using the DCM800 digital camera coupled to the Labomed TCM400 inverted light microscope and the software Scope Photo. The parameters evaluated in the morphological analyses were based on visible features under light microscopy such as the general size, structure and integrity of the eggs and worms (vulva, pharynx and cuticle). Behavioral analysis evaluated the following parameters: (i) spatial locomotion pattern, (ii) lethargy or difficulty in locomotion, (iii) presence of twitching (*i.e.*, uncontrolled muscle contraction) and (iv) presence of rolling (circular movement around the body axis). Three biological replicates were performed, each one consisting of three technical replicates (each one comprising all three groups: NC1, NC2 and EG). N = 600 worms/technical replicate/group. Statistical analyses (One Way ANOVA) were performed comparing only the groups within the same time point.

### 2.7. Development analysis.

*C. elegans* L2 larvae were centrifuged at 400,000 × *g* at 4°C for 1h and subsequently 30 worms (of each group: NC1, NC2 or EG) were deposited on NGM agar plates containing OP50 bacteria. The plates were maintained at 20°C during 10 days in the dark. After this period, viability and population growth (total final number of worms x 100 / number of worms initially plated) were determined. Three biological replicates were performed, each one consisting of three technical replicates (each one comprising all three groups: NC1, NC2 and EG). N = 30 worms/technical replicate/group. Statistical analyses (One Way ANOVA) were performed comparing only the groups within the same time point.

#### 2.8. Measurement of metabolic activity

Initially, *C. elegans* L2 larvae were separated in 100  $\mu$ l of M9 buffer. Subsequently, 100  $\mu$ L of MTT solution (10 mg/mL) were added in each tube. After that, they were centrifuged at 50, 100, 1,000, 100,000 or 400,000 × g at 4°C for 1h. Metabolic activity was measured using the MTT assay according to James and Davey (2007) with some modifications. After each experiment, worms were immediately immersed in liquid N<sub>2</sub> to interrupt the MTT metabolism. Subsequently, the solutions containing worms were centrifuged at 500 x g and the supernatant was discarded. Then, 200  $\mu$ L of DMSO were added to each tube and after 1 h 100  $\mu$ L of the solution were collected

and transferred to a 96-well plate for analysis using the Epoch Biotek spectrophotometer and the Gen5 2.06 program. The results were obtained by means of an absorbance reading at 575 nm (James and Davey, 2007). As internal control, only blank tests with the DMSO were analyzed. The comparison between the various *g*-forces was carried out by a normalization that considered the longer periods of acceleration and deceleration involved in exposures to 100,000 and 400,000 x *g*. Six technical replicates (each one comprising all three groups: NC1, NC2 and EG (50 - 400,000 x *g*). N = 150 worms/technical replicate/group. Statistical analyses (One Way ANOVA) were performed comparing only the groups within the same time point.

#### 2.9. Statistical analysis

Except for MTT assay (six technical replicates) all experiments were performed in biological triplicates (each one consisting of technical triplicates) and data are presented as mean values and standard deviations. Statistical analyses were performed using "One Way ANOVA" (with Student Newman post-hoc). Statistical differences were considered significant when  $p \le 0.05$ . Identical letters indicate those groups which are not statistically different. Distinct letters indicate those groups which are statistically different.

In some cases, one group may be statistically not different from only one specific group, within a larger set of groups indicated with a different letter. In these specific cases, those groups were indicated with hashtag (#), meaning they are not statistically different.

#### 3. Results

After exposure to centrifugation regimes, the first parameter analyzed was viability. Interestingly, viability did not decrease after exposure to 400,000 x g, *i.e.*, the values remained practically the same as those observed in the two controls (NC1 and NC2) (Fig. 1). Moreover, population growth measured 10 days after ultracentrifugation also did not reveal any decreases in reproductive potential or viability (Fig. 2). Likewise, morphological and behavioral analyses did not identify any structural or behavioral changes in *C. elegans* exposed to 400,000 x g (Fig. 3). MTT analysis indicated a significant (p <0.05) decrease in the metabolism between NC1 and experimental groups (EG 50 - 400,000 x g). A significant (p <0.05) decrease in metabolism was also observed between NC2 group and those exposed to 50, 1,000, 10,000 and 400,000 x g. Together, these data suggest a reduction in metabolic rate due to centrifugation; however, this effect is not proportional to the hyperacceleration regime, instead, it is stabilized (Fig. 4).

### 4. Discussion

Currently, ultracentrifugation has been widely used to evaluate and characterize the physical, metabolic and genetic responses of several organisms to *g*-forces (hypergravity regimes), generally in the range of  $10^1 - 10^2 \ge g$  (Casey *et al.*, Kim *et al.*, 2016, Tamaoki *et al.*, 2014).

Comparatively, few studies investigated the effects above  $10^4 \text{ x } g$ . In one of these studies, Beams and King (1936) exposed eggs of the nematode *Ascaris suum* to a condition similar to that adopted in the current work (400,000 x g for 1 hour). As a parameter to evaluate the viability after the ultra-acceleration, they evaluated cell divisions of the centrifuged eggs. Interestingly, they observed that after 48h, 90% of the eggs had cells that had divided at least once (Beams & King, 1936). According to them, the death of most of the organisms when subjected to a stress of such magnitude was due to physical and structural damages that did not affect Ascaris eggs due to mechanical protection provided by the shell. Therefore, the survival of nematodes larvae and adults to this magnitude of stress was not considered plausible.

The first and most important analysis performed in the current work was the determination of the viability percentage of *C. elegans* submitted to 400,000 x g (Fig. 1). Its notorious tolerance to this degree of physical stress allowed subsequent morphological (possible structural damages) and behavioral analyzes. The nematode *C. elegans* can exhibit several behavioral changes induced in response to stressors. In cases of large agglomeration, absence of food or exposure to high temperatures, for example, *C. elegans* can enter into an alternative state of development known as dauer larva (Ailion and Thomas, 2000; Golden and Ridley, 1982). In this larval stage, *C. elegans* metabolism drastically decreases and it becomes lethargic (Hart, 2006).

In addition, *C. elegans* may present other phenotypic changes such as *rolling* and the *twitching*. Feeding, reproductive activity and oviposition are other parameters that were evaluated during behavioral analyses and can be altered due to exposure to stressors (Hart, 2006; Moerman *et al.*, 1982). Surprisingly, no obvious or dramatic changes in the normal behavioral pattern were observed after centrifugation at 400,000 x g. Centrifugations of 3,000 x g for 1 min are frequent during various laboratory procedures involving *C. elegans*. Any researcher working with this species may have already observed that worms are very active soon after such routine procedures, something intuitively unexpected since the same g-force would be lethal in humans. Thus, it is noteworthy that these worms presented apparently normal agitation (swimming in M9 buffer) moments after their removal from the ultracentrifuge (400,000 x g), evidencing that this ultra-

acceleration is innocuous to them. The absence of any changes in viability, morphology and behavior verified after 400,000 x g centrifugation indicate that this nematode can withstand extremely high g-force values. However, the possible existence of internal structural damage caused by ultracentrifugation would not necessarily be detectable after the experimental procedure.

Therefore, the results of the development analysis were especially important to corroborated the morphological data (Fig. 3). The absence of changes in the population growth 10 days after the exposure to hypergravity indicated that ultracentrifugation at 400,000 x g is not able to affect worm's viability and does not compromise their correct development and reproductive potential (Fig. 3). Taken together, these data reveal that *C. elegans* is not only tolerant to this stress, but also suggest that it might tolerate g-forces much greater (500,000 x g or beyond).

In addition to these analyzes, evaluation of MTT conversion in *C. elegans* in provided a view of the metabolic status within different hyperacceleration conditions (50 to 400,000 x g) (Fig. 4). Changes in metabolism may occur in response to various factors and are observed in virtually every animal kingdom phylum (Guppy and Withers, 1999). In the parasitic nematode *Anguina tritici*, for example, the metabolic rate may reach 0.06% of the normal metabolism when it is submitted to extreme desiccation (Guppy and Withers, 1999 apud Bhatt and Rohde, 1970). Interestingly, the data presented in this work showed that *C. elegans* can tolerate 400,000 x g without going into such a deep state of metabolic depression. Moreover, our data reveal something new: even after submitting the worms to a g-force five orders of magnitude higher than that naturally experienced on Earth  $(1 \times g)$ , they remain alive and metabolically unchanged concerning the 50 x g group.

*C. elegans* is a fantastic species in biology and has recently been shown to be an interesting model to study several different conditions such as: epilepsy (Williams, *et al.*, 2004), sleep-like states (Raizen, *et al.*, 2008), tolerance to extreme desiccation (Erkut *et al.*, 2011. 2013) and photoperception (Ward *et al.*, 2008). The data obtained by our research group reveal for the first time that this worldwide known research model has one more intriguing feature in its biological repertoire: tolerance to extreme hyperacceleration. Our analyses evidences that *C. elegans* flexibly supports forces of 400,000 x g per 1h. Perhaps more impressive is the fact that the metabolism is not dramatically affected by such a physical stress.

Considering that life has an informational content too much vast to be explained by purely stochastic processes, researchers try to couple their empirical results with theological and philosophical premises in an attempt to explain how life could have originated on our planet (Burchell, 2004; Świeżyński, 2016). Among other theories, these efforts led to the panspermia

hypothesis, which deals with the possibility that "seeds of life" had seeded our planet, thus shifting the focus from life's origin problem and giving greater attention to experiments that demonstrate the plausibility of life's communication between celestial bodies. In this context, the volcanic activity is considered as being one of the natural phenomena present in several planets that would be able to eject bodies containing life forms towards space in lithopanspermia and interplanetary panspermia scenarios.

Interestingly, Melosh (1993) calculated the hypergravity that the life present in a volcanic fragment of Mars would have to endure during its acceleration towards space. Using computational simulations, she concluded that the maximum ejection acceleration predicted for a rock fragment ejected from Mars would be  $300,000 \times g$ . Surprisingly, ours results demonstrated that the model organism *C. elegans* can withstand hypergravity conditions superior to those estimated by Melosh (1993) without any impairments on viability, morphology, behavior or metabolism, which encourages further studies to decipher the genetic and physiological mechanisms involved in the resilience of this nematode to extreme hypergravity.

#### **5.** Conclusions

Considering the data presented in the current work we conclude that *C. elegans* can be used as a new model for studies on the effects of hypergravity in biology at different levels (molecular, morphological, behavioral and populational). Additionally, the condition tested here (400,000 x g at 4°C during 1h) did not alter viability, behavior, development, but only a minor reduction in metabolism. Therefore, our results prompt future analyzes exploring the maximum tolerance of *C. elegans* and other species to hypergravity. The development of ultracentrifuges, capable of reaching astonishing 1,000,000,000 x g (Gray, 1951) are key tools in this search. Furthermore, it is worth mentioning that the study of unicellular and multicellular life in conditions of hypergravity helps unraveling the limits of the gravitational spectrum compatible with life in the universe. This allows us to analyze the plausibility of the hypothesis that life as we known would exist in other planets.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. Hojo ETS and Dr. Montaldi APL FCP for help us during MTT analyses. We are also thankful to Prof. Roy Edward Larson (FMRP/USP) and MSc. Lopes

GS for granting us access to the ultracentrifuge. TAJS is recipient of studentship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil).

## Author Disclosure Statement.

TAJS and TCP have participated in the conception and design of this work and the analysis of the data, as well as the writing of the manuscript, taking public responsibility for its content. Both authors certify that no party have a direct financial interest in the results of this article. TAJS is recipient of studentships from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil).

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

# References

Ailion, M. and Thomas, J. H. (2000) Dauer formation induced by high temperatures in Caenorhabditis elegans. Genetics 156: 1047-1067.

Allen, l. (2001) Astrobiology. Nature 409: 1079.

Bhatt, B. D. and Rohde, R. A. (1970) The influence of environmental factors on the respiration of plant-parasitic nematodes. J Nematol 2: 277–285.

Beams, H. W. and King, R. (1936) Survival of Ascaris eggs after centrifuging. Science 84: 138.

Burchell, M. J. (2004) Panspermia today. Int J Astrobiology 3: 73-80.

Casey, T., Zakrzewska, E. I., Maple, R. L., Lintault, L., Wade, C. E., Baer, L. A., Ronca, A. E., and Plaut, K. (2012) Hypergravity disruption of homeorhetic adaptations to lactation in rat dams include changes in circadian clocks. Biol Open 1, 6: 570-81.

Chalfie, M. (2010) The 2009 Lindau Nobel Laureate meeting: Martin Chalfie, Chemistry. J Vis Exp 36.

Clark, T. K., Newman, M. C., Oman, C. M., Merfeld, D. M., and Young, L. R. (2015) Modeling human perception of orientation in altered gravity. Front Syst Neurosci 9:68.

Deguchi, S., Shimoshige, H., Tsudome, M., Mukai, S., Corkery, R. W., Ito, S., and Horikoshi, K. (2011) Microbial growth at hyperaccelerations up to 403,627 x g. Proc Natl Acad Sci U S A. 108: 7997–8002.

Erkut, C., Penkov, S., Khesbak, H., Vorkel, D., Verbavatz, J. M., Fahmy, K., and Kurzchalia, T. V. (2011) Trehalose renders the dauer larva of *Caenorhabditis elegans* resistant to extreme desiccation. Curr Biol 21, 15: 1331-6.

Erkut, C., Vasilj, A., Boland, S., Habermann, B., Shevchenko, A., and Kurzchalia, T. V. (2013) Molecular strategies of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva to survive extreme desiccation. PLoS One 8(12).

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806-811.

Gao, Z., Lic, D., Menga, C., Xu, D., Zhang, X., and Ye, N. (2013) Survival and proliferation characteristics of the microalga *Chlamydomonas sp.* ICE-L after hypergravitational stress pretreatment. Icarus 226: 971–979.

Gao, Y., Li, S., Xu, D., Wang, J., and Sun, Y. (2015) Changes in apoptotic microRNA and mRNA expression profiling in *Caenorhabditis elegans* during the Shenzhou-8 mission. J Radiat Res 56: 872-82.

Golden, J. W. and Riddle, D. L. (1982) A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science 218: 578-580.

Guppy, M. and Withers, P. (1999) Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. Biol Rev 74, 1: 1-40.

Gray, G. W. (1951) The Ultracentrifuge. Sci Am 184: 42-51.

Halliday, D., Resnick, R., and Walker, J. (1993) "Vectors" In Fundamentals of Physics. Ed. John Wiley & Sons. Inc. NY. USA, 3: 97–130.

Hart, A. C. (2006) ed. Behavior WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.87.1, <u>http://www.wormbook.org</u>.

Honda, Y., Higashibata, A., Matsunaga, Y., Yonezawa, Y., Kawano, T., Higashitani, A., Kuriyama, K., Shimazu, T., Tanaka, M., Szewczyk, N. J., Ishioka, N., and Honda, S. (2012) Genes down-regulated in spaceflight are involved in the control of longevity in *Caenorhabditis elegans*. Sci Rep 2: 487.

Johnson, T. E. and Nelson, G. A. (1991) *Caenorhabditis elegans*: a model system for space biology studies. Exp Geront 26: 299-309.

James, C. E. and Davey, M. W. (2007) A rapid colorimetric assay for the quantitation of the viability of free-living larvae of nematodes in vitro. Parasitol Res. 101: 975-80.

Kalichamy, S. S., Lee, T. Y., Yoon, K. H., and Lee, J. I. (2016) Hypergravity hinders axonal development of motor neurons in *Caenorhabditis elegans*. PeerJ, 4: e2666.

Kim, N., Dempsey, C. M., Kuan, C. J., Zoval, J. V., O'Rourke, E., Ruvkun, G., Madou, M. J., and Sze, J. Y. (2007) Gravity force transduced by the MEC-4/MEC-10 DEG/ENaC channel modulates DAF-16/FoxO activity in *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 177: 835-45.

Kim, Y. J., Chung, J. S., Jang, T. Y., Kim, Y. H., and Chin, H. S. (2016) Hypergravity Effects on the Retina and Intraocular Pressure in Mice. Aerosp Med Hum Perform 87: 13-7.

Krause, A. W., Carley, W. W., Webb, W. W. (1984) Fluorescent erythrosin B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture. J Histochem Cytochem 32: 1084-1090.

Maupas, É. (1899) La mue et l'enkystement chez les nématodes. Arch Zool Exp Gen 7: 563-628.

Maupas, É. (1900) Modes et formes de reproduction des nematodes. Arch Zool Exp Gen 8: 463–624, Retrieved 2009-05-27.

Melosh, H. (1993) Blasting rocks off planets. Nature 363: 498–499.

Möller, G. (2002) The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2002. Scand J Immunol 56: 435.

Moerman, D. G., Plurad, S., Waterston, R. H., and Baillie, D. L. (1982) Mutations in the unc-54 myosin heavy chain gene of *Caenorhabditis elegans* that alter contractility but not muscle structure. Cell 29, 3: 773-81.

Onodera, A., Yanase, S., Ishii, T., Yasuda, K., Miyazawa, M., Hartman, P. S., and Ishii N. (2010) Post-dauer life span of *Caenorhabditis elegans* dauer larvae can be modified by X-irradiation. J Radiat Res 51: 67-71.

Qiao, L., Luo, S., Liu, Y., Li, X., Wang, G., and Huang, Z. (2013) Reproductive and locomotory capacities of *Caenorhabditis elegans* were not affected by simulated variable gravities and spaceflight during the Shenzhou-8 mission. Astrobiology 13: 617-25.

Raizen, D. M., Zimmerman, J. E., Maycock. M. H., Ta, U. D., You, Y. J., Sundaram, M. V., and Pack, A. I. (2008) Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. Nature 451: 569-72.

Russomano, T., Rizzatti, M. R., Coelho, R. P., Scolari, D., DE Souza, D., Prá-Veleda, P. (2007) Effects of simulated hypergravity on biomedical experiments. IEEE Eng Med Biol Ma 26: 66-71.

Saldanha, J. N., Pandey, S. and Powell-Coffmana, J. A. (2016) The effects of short-term hypergravity on *Caenorhabditis elegans*. Life Sci Space Res10: 38–46.

Sasagawa, Y., Saito, Y., Shimizu, M., Takahashi, H., Ishioka, N., Fukui, K., Yamashita, M., Higashitani, A. (2003) Effects of gravity on early embryogenesis [correction of embryogenesis] in *Caenorhabditis elegans*. Biological Sciences in Space Journal 17: 217-8.

Souza, T. A. J., Carli, G. J. and Pereira, T. C. (2017) Survival potential of the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus* submitted to extreme abiotic stresses. Invertebrate Surviv J 14: 85-93.

Świeżyński A. (2016) Where/when/how did life begin? A philosophical key for systematizing theories on the origin of life. Int J Astrobiology 15 (4): 291-299.

Tamaoki, D., Karahara, I., Nishiuchi, T., Wakasugi, T., Yamada, K., and Kamisaka, S. (2014) Effects of hypergravity stimulus on global gene expression during reproductive growth in Arabidopsis. Plant Biol 16: 179-86.

Tang, H., Chen, L., Liu, J., Shi, J., Li, Q., Wang, T., Wu, L., Zhan, F., and Bian, P. (2016) Radioadaptive Response for Reproductive Cell Death Demonstrated in In Vivo Tissue Model of *Caenorhabditis elegans*. Radiat Res 185: 402-10.

Ujisawa, T., Ohta, A., Okahata, M., Sonoda, S., Kuhara, A. (2014) Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in *C. elegans*. Protocol Exchange.

Williams, S. N., Locke, C. J., Braden, A. L., Caldwell, K. A., and Caldwell, G. A. (2004) Epilepticlike convulsions associated with LIS-1 in the cytoskeletal control of neurotransmitter signaling in *Caenorhabditis elegans*. Hum. Mol. Genet. 13, 18: 2043-59.



FIG. 1. Survival percentage (viability) of *C. elegans* after the exposure to 400,000 x g for 1 h. NC1: non-centrifuged worms in M9 solution at room temperature (20°C) during 1 h. NC2: non-centrifuged worms in M9 solution at 4°C during 1 h. EG: centrifuged worms in M9 solution at 4°C (400,000 x g for 1h). The experiments were performed in technical and biological triplicates. Number of worms (mixed population) per experiment: 600. Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05).



FIG. 2. Population growth of *C. elegans* measured 10 days after exposure to the different experimental conditions. NC1: non-centrifuged worms in M9 solution at room temperature (20°C). NC2: non-centrifuged worms in M9 solution at 4°C during 1 h. EG: centrifuged worms in M9 solution at 4°C (400,000 x g for 1h). The experiments were performed in technical and biological triplicates. Number of worms (input L2 larvae) per experiment: 30. Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05).



FIG. 3. A-C. Images of worms on NGM agar plates after exposure to the different hyperacceleration. A. NC1: non-centrifuged worms in M9 solution at room temperature (20°C); B. NC2: non-centrifuged worms in M9 solution at 4°C during 1 h; C. EG: centrifuged worms in M9 solution at 4°C (400,000 x g for 1h). The experiments were performed in technical and biological triplicates.



FIG. 4. Evaluation of *C. elegans* metabolic rate under different hyperacceleration regimes. NC1: non-centrifuged worms in M9 solution at room temperature (20°C) during 1 h. NC2: non-centrifuged worms in M9 solution at 4°C during 1 h. EG: centrifuged worms in M9 solution at 4°C (50 - 400,000 x g for 1h). The experiments were performed in technical and biological triplicates. Number of worms (larvae L2) per experiment: 150. Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05).