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

Danyel Fernandes Contiliani

**Análises *in silico* de metalotioneínas (MTs) e a tolerância de
Panagrolaimus superbus à hipóxia por imersão em matriz metálica de Gálio**

RIBEIRÃO PRETO, SP

2020

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

Danyel Fernandes Contiliani

**Análises *in silico* de metalotioneínas (MTs) e a tolerância de
Panagrolaimus superbus à hipóxia por imersão em matriz metálica de Gálio**

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

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

RIBEIRÃO PRETO, SP

2020

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

Ficha catalográfica

Contiliani, Danyel Fernandes

Análises *in silico* de metalotioneínas (MTs) e a tolerância de *Panagrolaimus superbus* à hipóxia por imersão em matriz metálica de Gálio.

Danyel Fernandes Contiliani. Ribeirão Preto: USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

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

1. Anidrobiose. 2. Metalotioneína 3. *Panagrolaimus superbus* 4. Gálio

Apoio e suporte financeiro

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

- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pelo espaço físico
 - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
 - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
 - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
-

Dedico esta dissertação aos meus pais, Dalmo e Alzira, pelo amor incondicional que garantiu a boa construção do meu caráter e a possibilidade de contribuir positivamente à sociedade – vocês são os pilares fundamentais do meu ser.

Obrigado pela oportunidade de ter vocês como pais.

Agradecimentos

Agradeço a tudo que contribuiu de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Tiago Campos Pereira por ter sido incrível e animador em cada conversa que tivemos ao longo dos anos. Desde 2017, meu crescimento pessoal e profissional foi intensificado com as oportunidades que você me ofereceu e com nosso convívio diário. Obrigado por se tornar meu exemplo acadêmico e contribuir diretamente para a realização das minhas conquistas acadêmicas desde então.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante o tempo em que estive no mestrado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento à pesquisa.

Agradeço ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pela infraestrutura e espaço físico que possibilitaram o desenvolvimento das atividades acadêmicas durante o mestrado.

Agradeço ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo crescimento intelectual por meio das disciplinas e pelos auxílios cedidos ao longo destes anos. Em especial, agradeço à secretária Susie Nalon pelos cuidados e por toda a disponibilidade que me forneceu até mesmo antes do meu ingresso ao mestrado.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Genética Molecular da Anidrobiose: Gabriel de Carli, Vitor Nolasco e Yasmin de Araújo. Vocês foram as pessoas que fizeram a minha rotina ser mais leve com nossas conversas, risadas e com o espírito cooperativo em ambiente de trabalho. Obrigado pela incrível experiência de ter feito parte do grupo de vocês!

Agradeço aos amigos de longa data que a vida me apresentou, Caio, André, Felipe, Bruno, Adriel, Matheus e Renato, por sempre tornarem os momentos difíceis mais leves e os felizes mais intensos. Também agradeço aos amigos que os tempos de faculdade me trouxeram, Giordano, Gustavo R., Gustavo M., Murilo, Gabriel, André, Guilherme G., Renan B., Ailton, Dimas, Guilherme e Renan Bin – vocês tornaram os anos de graduação mais ricos com conversas e momentos incríveis.

“Os dois ouviram silenciosamente a água, que para eles não era apenas água, mas a voz da vida, a voz do Ser, a voz do devir perpétuo.”

Herman Hess, Siddharta

RESUMO**Análises *in silico* de metalotioneínas (MTs) e a tolerância de *Panagrolaimus superbus* à hipóxia por imersão em matriz metálica de Gálio.**

O nematoide de vida livre *Panagrolaimus superbus* é capaz de adentrar um estado de animação suspensa quando exposto à dessecação extrema – fenômeno denominado como anidrobiose (vida sem água). Durante o estado seco, organismos anidrobiontes toleram a uma diversidade de estresses físicos, tais como extremos de temperatura, vácuo e hiperaceleração. Metalotioneínas (MTs) são proteínas ubíquas, com cadeias curtas, capazes de atuar na detoxificação e homeostase de metais pesados devido ao alto teor de cisteínas em suas cadeias. Considerando que organismos anidrobiontes dessecados se mantêm viáveis por longos períodos em solos secos, nos quais são exibidas altas concentrações de íons metálicos, nós levantamos a hipótese de que estes organismos apresentem tolerância a metais pesados promovida por eventuais diferenças estruturais em suas MTs. Portanto, os objetivos deste trabalho foram investigar a tolerância de *P. superbus* à imersão completa em Gálio (Ga), analisando sua viabilidade e crescimento populacional, e identificar diferenças estruturais de MTs entre organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes, por meio de análises *in silico* (composição e conservação de cisteínas, modelagem estrutural, análise e alinhamento de estruturas primárias e terciárias, e afinidade por ligantes). Os resultados encontrados demonstram a alta tolerância de *P. superbus* ao confinamento hipóxico em Ga por 7 dias, não apresentando efeitos negativos em sua viabilidade e em seu crescimento populacional. Adicionalmente, os resultados das análises *in silico* mostram valores superiores na composição e no número de cisteínas conservadas em MTs não-anidrobióticas, mas não apresentaram diferenças em estruturas terciárias ou na interação com ligantes. Portanto, nós relatamos pela primeira vez a preservação de um organismo em anidrobiose no interior de um metal pesado. Entretanto, sugerimos que esta tolerância mediada pela anidrobiose não seja conferida por diferenças estruturais em MTs, tornando-se provável a atuação destas a nível transcricional ou o envolvimento de um conjunto de elementos da maquinaria de reparo de anidrobiose.

Palavras-chave: Anidrobiose, Metalotioneína, Gálio, *Panagrolaimus superbus*

ABSTRACT***In silico* analysis of metallothioneins (MTs) and the tolerance of *Panagrolaimus superbus* to hypoxia by immersion in a Gallium matrix.**

The free-living nematode *Panagrolaimus superbus* is able to enter into a state of suspended animation when exposed to extreme desiccation – phenomenon known as anhydrobiosis (life without water). During the dry state, anhydrobiotic organisms tolerate several physical stresses, such as extremes of temperature, vacuum and hyperacceleration. Metallothioneins (MTs) are ubiquitous proteins with short chains, capable of acting on detoxification and homeostasis of heavy metals due to the high content of cysteines in their chains. Considering that desiccated anhydrobiotic organisms remain viable for long periods in dry soils, in which high concentrations of metal ions are exhibited, we hypothesized that these organisms show tolerance to heavy metals due to structural differences in their MTs. Therefore, the objectives of this work were to investigate the tolerance of *P. superbus* to complete immersion in Gallium (Ga), by analyzing its viability and population growth, and to identify structural differences in MTs between anhydrobiotic and non-anhydrobiotic organisms by performing *in silico* analyses (cysteine composition and conservation, structural modeling, primary and tertiary structure analyses and alignment, and ligand affinity). The results demonstrate the high tolerance of *P. superbus* to hypoxic confinement in Ga for 7 days, with no negative effects on its viability and population growth. Additionally, the results of *in silico* analyses show higher values of cysteine composition and conservation in non-anhydrobiotic MTs, but no differences in tertiary structures and ligand interactions were shown. Thus, we report for the first time the preservation of an anhydrobiotic organism inside a heavy metal matrix. However, we suggest that this anhydrobiosis-mediated tolerance is not conferred by structural differences in MTs, but by their differential gene expression and/or involve a set of elements of the anhydrobiosis repair machinery.

Keywords: Anhydrobiosis, Metallothionein, Gallium, *Panagrolaimus superbus*

Lista de Siglas, Símbolos, Acrônimos e Abreviaturas

~	Aproximadamente
*	Diferença estatisticamente significativa
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
α	Alfa
β	Beta
Å	Ångström
°C	Grau Celsius (unidade de temperatura)
¹⁴ CO ₂	Dióxido de carbono (marcado radioativamente com Carbono-14)
-OH	Hidroxila
Ace1	Fator de transcrição Ace1
Ag	Prata
Al	Alumínio
Apo-MT	Metalotioneína em sua forma isenta de ligantes
BLAST	(<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>): Ferramenta de pesquisa por alinhamento local
BmtA	Metalotioneína bacteriana A
CeMT1	Metalotioneína 1 de <i>C. elegans</i>

CeMT2	Metalotioneína 2 de <i>C. elegans</i>
Cd	Cádmio
Cys	Aminoácido Cisteína
cDNA	DNA complementar
CH1	Controle hidratado 1
CN1	Controle negativo 1
CN2	Controle negativo 2
Cu	Cobre
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
d-[U-14C]	Glicose (marcada radioativamente com Carbono-14)
EA	Engenharia anidrobiótica
<i>e.g.</i>	(<i>Exempli gratia</i>): locução latina que significa “por exemplo”
<i>et al.</i>	(<i>et alia</i>): e outros colaboradores
Fe	Ferro
Fe (III)	Ferro-III
FPKM	(<i>Fragments Per Kilobase Million</i>): Fragmentos a cada 1.000 nucleotídeos por milhão
g	força de aceleração equivalente à gravidade terrestre (9,8 metros por segundo elevado ao quadrado)
g:	Gramma (unidade de massa)

g/g	Proporção massa por massa
Ga	Gálio
Ga-68	Isótopo radioativo de Gálio
GaAs	Arsenieto de Gálio
GaN	Nitreto de Gálio
GPa	Giga Pascal (unidade de pressão)
h	Hora (unidade de tempo)
H	Hidrogênio
H ₂ O	Água
Hg	Mercúrio
<i>i.e.</i>	(<i>id est</i>): isto é
In	Índio
J m ⁻²	Joule por metro quadrado (unidade de energia)
Kelvin	Kelvin (unidade de temperatura)
L1	Larvas no 1º estágio de desenvolvimento
L2	Larvas no 2º estágio de desenvolvimento
L3	Larvas no 3º estágio de desenvolvimento
L4	Larvas no 4º estágio de desenvolvimento
LC ₅₀	(<i>Lethal Concentration-50</i>): Concentração letal para 50% dos indivíduos
Luc	Enzima luciferase

M9	Solução tampão isosmótica para <i>P. superbis</i>
mg/L	Miligramas por litro (proporção massa por volume)
mL	Mililitro
MT	Metalotioneína
<i>mtl-1</i>	<i>Metallothionein-like 1</i>
<i>mtl-2</i>	<i>Metallothionein-like 2</i>
m/v	Proporção massa por volume
NaClO	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	(<i>National Center for Biotechnology Information</i>) Base de dados de informações biotecnológicas
NGM	(<i>Nematode Growth Medium</i>): meio de cultivo para nematoides
O ₂	Oxigênio molecular
OP50	Linhagem de bactéria da espécie <i>Escherichia coli</i>
<i>p</i>	P-valor
PDB	(<i>Protein Data Bank</i>): Banco de dados proteicos
Pv11	Linhagem de células tolerantes à dessecação
rDNA	DNA ribossomal
RMSD	(<i>Root mean square deviation</i>): Raiz quadrada do desvio padrão entre átomos sobrepostos (em ångström)

TG1	Tratamento em Gálio 1
TG2	Tratamento em Gálio 2
Tl	Tálio
UniProt	Base de dados proteicos
UPGMA	(<i>Unweighted pair group with arithmetic mean</i>): método de agrupamento hierárquico entre linhagens evolutivas
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
Zn	Zinco

Lista de Figuras

Figura 1. Representantes de espécies anidrobióticas dos cinco reinos biológicos.....	4
Figura 2. Micrografia de <i>P. superbis</i> em meio de cultivo.....	5
Figura 3. Processo de dessecação e manutenção de macromoléculas.....	6
Figura 4. Vacina com tecnologia baseada em anidrobiose.....	10
Figura 5. Estrutura tridimensional da metalotioneína (MT) de leveduras.....	11
Figura 6. Natureza gradual das propriedades de MTs de diversos organismos.....	13
Figura 7. Gálio (Ga) em estado sólido sob temperatura ambiente.....	14
Figura 8. Blocos de metal Ga envolvendo nematoides.....	23
Figura 9. Conteúdo de cisteínas em MTs.....	30
Figura 10. Sequências primárias de MTs procarióticas.....	31
Figura 11. Sequências primárias de MTs eucarióticas.....	32
Figura 12. Sequências primárias de MTs procarióticas e eucarióticas.....	33
Figura 13. Alinhamentos de estruturas terciárias (A) e primárias (B) de cadeias- α de MTs de mamíferos não-anidrobiontes.....	34
Figura 14. Alinhamentos de estruturas terciárias (A) e primárias (B) de cadeias- α de MTs de bactérias não-anidrobiontes.....	35
Figura 15. Alinhamentos de estruturas terciárias (A) e primárias (B) de cadeias- α de MT de fungos não-anidrobionte e anidrobionte.....	35
Figura 16. Estruturas tridimensionais de MTs de cianobactérias não-anidrobiontes.....	36
Figura 17. Estruturas tridimensionais de MTs de cianobactérias anidrobiontes.....	37
Figura 18. Árvore filogenética de cianobactérias.....	38
Figura 19. Resultados de alinhamentos entre modelos de MTs de cianobactérias.....	39
Figura 20. Viabilidade de <i>P. superbis</i>	42
Figura 21. Crescimento populacional de <i>P. superbis</i>	43
Figura 22. Tolerância mediada pela anidrobiose.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequências de MTs de organismos não-anidrobiontes.....	25
Tabela 2. Sequências de MTs de organismos anidrobiontes.....	26
Tabela 3. Estruturas terciárias de MTs.....	27
Tabela 4. Estruturas análogas no PDB – não-anidrobiontes.....	40
Tabela 5. Estruturas análogas no PDB – anidrobiontes.....	40
Tabela 6. Interações de MTs não-anidrobióticas e Zn.....	41
Tabela 7. Interações de MTs anidrobióticas e Zn.....	41

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Anidrobiose	2
1.1.1 Histórico e conceitos gerais	2
1.1.2 Processos de dessecação e manutenção celular	5
1.1.3 Animação suspensa: um estado ametabólico?	7
1.1.4 Poliextremotolerância e preservação	7
1.1.5 Engenharia anidrobiótica	8
1.2 Metalotioneínas	10
1.2.1 Visão geral	10
1.2.2 Metalotioneínas e íons metálicos	11
1.3 Gálio	14
2. Hipótese	16
2.1 Hipótese do trabalho	17
3. Objetivos	18
3.1 Objetivos	19
3.1.1 Objetivos gerais	19
3.1.2 Objetivos específicos	19
4. Material e Métodos	20
4.1 Manutenção de nematoides	21
4.2 Sincronização das populações de nematoides	21
4.3 Ensaio de dessecação	21
4.4 Imersão em matriz de Gálio	22
4.5 Ensaio de viabilidade	24
4.6 Ensaio de crescimento populacional	24
4.7 Análise estatística	24
4.8 Análises <i>in silico</i>	25
4.8.1 Obtenção de sequências de MTs	25
4.8.2 Análise da composição de cisteínas	26
4.8.3 Alinhamento múltiplo de sequências	26
4.8.4 Análise de estruturas terciárias	27
4.8.5 Modelagem estrutural de MTs	27
5. Resultados	29
5.1 Análises <i>in silico</i>	30
5.1.1 Análise da composição de cisteínas	30
5.1.2 Alinhamento múltiplo de sequências	30

5.1.3 Análise de estruturas terciárias	34
5.1.4 Modelagem estrutural de MTs	36
5.2 Imersão de <i>P. superbus</i> em matriz de Gálio.....	42
5.2.1 Viabilidade	42
5.2.2 Crescimento populacional	43
6. Discussão	44
6.1 Análises <i>in silico</i> de MTs	45
6.2 Imersão de <i>P. superbus</i> em matriz de Gálio.....	48
7. Conclusões.....	52
8. Sugestões para trabalhos futuros.....	54
9. Bibliografia	56
10. Anexos	67
11. Apêndices	70

1. Introdução

1.1 Anidrobiose

1.1.1 Histórico e conceitos gerais

Nascido em Delft na Holanda, em 1632, o microbiologista Antonie Philips van Leeuwenhoek é comumente conhecido como “o Pai da Microbiologia” devido às suas contribuições científicas e ao seu pioneirismo nas áreas de microscopia e microbiologia. Em 1702, utilizando um microscópio de lente única desenvolvido por conta própria, van Leeuwenhoek analisava amostras secas de calhas do telhado, as quais não apresentavam sinais de vida. De forma inusitada, após a adição de água a essas amostras, foi observada a manifestação de vida ativa por organismos microscópicos, designados como “animálculos” pelo microbiologista (LEEUWENHOEK, 1704; revisto em TUNNACLIFFE e LAPINSKI, 2003). Atualmente, estes animais são considerados semelhantes ao rotífero bdeloide *Philodina roseola* (FORD, 1981).

Quase dois séculos após a descoberta de van Leeuwenhoek, em 1894, o zoologista francês Alfred Giard cunhou o termo **anidrobiose** (do grego: “vida sem água”) para descrever o estado altamente estável no qual alguns organismos se adentram frente à dessecação extrema (GIARD, 1884). Neste contexto, estes organismos se encontram em um estado de *anabiose* (ou vida latente), não apresentando quaisquer taxas metabólicas suficientes para serem mensuradas por meio de tecnologias atuais. Curiosamente, quando as condições ambientais voltam a ser favoráveis (*e.g.*, reidratação do solo pela chuva), estes animais prosseguem suas atividades, de forma viável, com configurações metabólicas normais readquiridas (KEILIN, 1959).

Em 1959, o entomologista David Keilin também considerou a anidrobiose como uma forma de **criptobiose** (do grego: “vida escondida”). Subsequentemente, a criptobiose foi dividida em diferentes categorias: *criobiose* (baixas temperaturas); *osmobiose* (alta osmolaridade); *termobiose* (altas temperaturas); *anoxibiose* (ausência de oxigênio) e, por fim, o foco deste trabalho, a *anidrobiose* (dessecação extrema) (KEILIN, 1959). Considerando a total suspensão reversível da atividade metabólica como marca da criptobiose, James Clegg propôs um terceiro estado de organização biológica além dos estados vivo e morto - o criptobiótico (CLEGG, 2001).

Conforme a comunidade científica foi direcionando o olhar para estes raros organismos anidrobióticos, diversas espécies anidrobióticas foram encontradas nos cinco

reinos biológicos: (i) *Monera* - bactéria *Deinococcus radiodurans* (figura 1A) (MATTIMORE e BATTISTA, 1996); (ii) *Protista* – o ciliado *Colpoda inflata* (figura 1B) (MÜLLER et al., 2010); (iii) *Fungi* – a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (figura 1C) (SCHEBOR et al., 2000); (iv) *Animalia* – o tardígrado *Ramazzottius varieornatus* (figura 1D) (YOSHIDA et al., 2017) e (v) *Plantae* – a traqueófito *Selaginella lepidophylla* (figura 1E) (OLIVER et al., 2000).

Figura 1. Representantes de espécies anidrobióticas dos cinco reinos biológicos. (A) Reino *Monera* - *Deinococcus radiodurans*, (B) Reino *Protista* – *Colpoda inflata*, (C) Reino *Fungi* – *Saccharomyces cerevisiae*, (D) Reino *Animalia* – *Ramazzottius varieornatus* e (E) Reino *Plantae* – *Selaginella lepidophylla* (em estados seco e hidratado) (Fonte: The Oak Ridge National Laboratory, 2002; LEHLE, 2008; SPL, 2015; ARAKAWA e HIGASHIYAMA, 2017).

Os organismos anidrobióticos são divididos em duas categorias de acordo com a fase de desenvolvimento em que são capazes de sobreviver à dessecação extrema

(JÖNSSON, 2005). Aqueles que se adentram ao estado ametabólico apenas em um determinado estágio de desenvolvimento (*e.g.*, esporos, sementes) são categorizados como anidrobiontes **estágio-específicos**. Por outro lado, organismos que possuem a capacidade de sobreviver a dessecação extrema em qualquer fase do ciclo de vida são chamados de **holo-anidrobiontes** (JÖNSSON, 2005). Neste trabalho, uma espécie de nematoide holo-anidrobionte foi utilizado: o verme de vida livre *Panagrolaimus superbus* (SHANNON et al., 2005).

Figura 2. Micrografia de *P. superbus* em meio de cultivo. O holo-anidrobionte *P. superbus*, pertencente à família Panagrolaimidae, apresenta hábito alimentar bacteriívoro e, portanto, se alimenta de bactérias *Escherichia coli* da linhagem OP50.

1.1.2 Processos de dessecação e manutenção celular

Em geral, o estado biológico da animação suspensa é manifestado em resposta ao processo de dessecação, o qual é subdividido em três etapas: (i) **desidratação**, (ii) **dessecação** e (iii) **estado seco** (figura 3).

Figura 3. Processo de dessecação e manutenção de macromoléculas. (A) Condição normal de uma célula hidratada (pontos azuis representam moléculas de H₂O). (B) Etapa de desidratação e início de síntese de solutos compatíveis (pontos pretos). (C) Perfil de anidrobiose com componentes intracelulares termodinamicamente estabilizados pelas interações com solutos compatíveis.

Inicialmente, na fase de **desidratação** (figura 3B) as células enfrentam perdas progressivas de água, mas suas estruturas e biomoléculas (*e.g.*, proteínas, membranas e ácidos nucleicos) ainda são parcialmente hidratados por moléculas de H₂O remanescentes. Contudo, frente a esse processo, o microambiente intracelular sofre alterações no pH e aumento da concentração de solutos e da viscosidade da matriz aquosa. Dessa forma, as forças intermoleculares (*i.e.*, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals) começam a ser fragilizadas por estas alterações no meio intracelular, levando à instabilidade das biomoléculas (CROWE, 1971; STRYER, 1999) e, portanto, diminuindo a eficiência das vias bioquímicas (CLEGG, 1978; WOMERSLEY e SMITH, 1981). Embora as células sofram essas alterações pela desidratação, ainda são metabolicamente ativas e respondem de forma estratégica para adentrarem à animação suspensa.

Subsequentemente, o metabolismo é suspenso na etapa de **dessecação**, uma vez que o conteúdo total de água intracelular pode chegar a valores equivalentes a 0,1 g/g de massa seca (SAKURAI et al., 2008). Neste contexto, a síntese prévia e acumulativa de solutos compatíveis previne danos letais às células. Os solutos compatíveis consistem em pequenas moléculas orgânicas (*e.g.*, trealose e sacarose) que trabalham como ‘agentes osmoprotetores’ (LANG, 2007), garantindo a estabilidade das biomoléculas e estruturas celulares por meio da substituição das moléculas de H₂O, realizando ligações de

hidrogênio e contrabalanceando a osmolaridade extracelular durante as fases iniciais do processo de dessecação (revisto em TUNNACLIFFE e LAPINSKI, 2003). Esse acúmulo de solutos compatíveis levou à hipótese da substituição de água e **vitrificação** (CLEGG et al., 1982; BURKE, 1986; SUN e LEOPOLD, 1997; CROWE et al., 1998).

Por fim, a anidrobiose é representada pelo **estado seco** (figura 3C), no qual a matriz celular aquosa é completamente substituída por uma matriz sólida e amorfa – processo de vitrificação (SUN e LEOPOLD, 1997; CROWE et al., 1998; SAKURAI et al., 2008). Essa matriz vítrea é composta pelos solutos compatíveis que foram acumulados ao decorrer do processo de dessecação. Este acúmulo garante a estabilização cinética e o aumento da viscosidade intracelular, retirando a ação do tempo nos componentes celulares e inviabilizando quaisquer reações bioquímicas – uma expressão natural do estado de **animação suspensa** (revisto em TUNNACLIFFE e LAPINSKI, 2003).

Embora os dissacarídeos não-redutores e as proteínas hidrofílicas LEA (do inglês, *late embryogenesis abundant proteins*) desempenham papéis fundamentais no processo de dessecação (KEILIN, 1959; CROWE, 1971; WOMERSLEY E SMITH, 1981; CROWE et al., 1992, 1998; SUN E LEOPOLD, 1997; CLEGG, 2001; SAKURAI et al., 2008), não são suficientes para garantir a viabilidade após a anidrobiose. Em contrapartida, a capacidade de um organismo tolerar a dessecação extrema não é de acordo com a concentração intracelular destes açúcares, uma vez que já foi evidenciado que algumas espécies de rotíferos são capazes de adentrar ao processo de anidrobiose mesmo sem o acúmulo de dissacarídeos não-redutores (revisto em LAPINSKI e TUNNACLIFFE, 2003).

Garcia de Castro e Tunnacliffe (2000) desenvolveram células de ratos geneticamente modificadas, buscando aumentar a síntese de trealose. Mesmo que as células tenham acumulado grandes quantidades do açúcar e, incrivelmente, apresentaram tolerância adicional à desidratação, estas foram incapazes de adentrarem ao processo de anidrobiose (GARCIA DE CASTRO E TUNNACLIFFE, 2000). Similarmente, em *Arabidopsis thaliana* foi visto que mesmo com o acúmulo de sacarose em suas sementes, estas também foram incapazes de tolerar condições de dessecação extrema (OOMS et al., 1993).

Neste sentido, estudos demonstram que os mecanismos da anidrobiose são mais complexos do que o simples acúmulo de solutos compatíveis e que, portanto, outros

componentes da maquinaria de reparo da anidrobiose são imprescindíveis para a tolerância à dessecação extrema, tais como o próprio sistema de reparo de ácidos nucleicos, o sistema antioxidante e proteínas de choque térmico (do inglês, *heat shock proteins*) (revisto em LAPINSKI E TUNNACLIFFE, 2003; REARDON et al., 2010; TYSON et al., 2012). Assim, a totalidade dos elementos operatórios da anidrobiose ainda permanece desconhecida.

1.1.3 Animação suspensa: um estado ametabólico?

Outro enigma dentro do campo da anidrobiose que ainda permanece mal resolvido é se, de fato, o estado de animação suspensa realmente não apresenta taxa metabólica. Diferentes (mas ainda poucos) estudos promovem diferentes metodologias para investigar a presença (ou ausência) de metabolismo em cenários de anidrobiose.

Em um estudo, nematoides anidrobióticos da espécie *Ditylenchus dipsaci* se alimentaram de glicose radioativamente marcada (glicose d_4 [U- ^{14}C]) e suas taxas respiratórias (*i.e.*, captação de O_2 e produção de $^{14}\text{CO}_2$) não foram detectadas durante a animação suspensa, apenas após a reidratação (BARRETT, 1982). De maneira similar, rotíferos bdeloides secos sobreviveram em garrafas seladas contendo 99,998% de gás argônio puro ($[\text{O}_2] < 0.0004\%$) por 21 dias – se houvesse metabolismo, certamente haveria demanda de O_2 (ÖRSTAN, 1998). Por fim, abordagens de simulação computacional calcularam que o conteúdo de água remanescente em células anidrobióticas secas (*i.e.*, cerca de 0.1 g/g massa seca) é impossível de manter um metabolismo ativo (CLEGG, 1978, 1986; POTTS, 1994).

Embora estas abordagens tenham fornecido evidências para esta questão, a natureza ametabólica da anidrobiose ainda é arduamente aceita (WHARTON, 2015). Assim, estudos adicionais são necessários para suportar essa mudança de paradigma.

1.1.4 Poliextremotolerância e preservação

De forma substancial, quando os organismos anidrobiontes se encontram em animação suspensa, isto é, no estado seco e (possivelmente) isentos de metabolismo ativo, são capazes de tolerar uma série de condições extremas para a vida – fenômeno denominado como **poliextremotolerância**. Inúmeras evidências apresentam a diversidade de estresses a que estes organismos são capazes de tolerar, tais como: temperaturas entre ~ 0 Kelvin (BECQUEREL, 1950) e $+151^{\circ}\text{C}$ (RAHM, 1923), radiação ionizante de 500 J m^{-2} (MOSELEY e EVANS, 1983), pressões hidrostáticas de 1,2 GPa (HORIKAWA et al., 2009), vácuo (REBECCHI et al., 2009) e hiperaceleração de $400.000 \times g$ (de SOUZA e PEREIRA, 2018).

Ademais, a animação suspensa também fornece tempos de vida mais longos a estes organismos em comparação às suas longevidades regulares (em condições hidratadas). Existem registros de rotíferos, nematoides e tardígrados que foram preservados a seco por mais de 30 anos (STEINER e ALBIN, 1946). De forma extraordinária, porém questionável, há outros relatos que afirmam a viabilidade de sementes de lótus após cerca de 1000 anos (SHEN et al., 1995), de nematoides *Panagrolaimus* aff. *detritophagus* e *Plectus* aff. *parvus* após cerca de 30.000 anos (SHATILOVICH et al., 2018) e, por fim, a preservação de bactérias halotolerantes por mais de 250 milhões de anos em cristais de sais (VREELAND et al., 2000).

1.1.5 Engenharia anidrobiótica

A busca pela compreensão dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos da anidrobiose pode auxiliar na transformação destes fenômenos biológicos em aplicações biotecnológicas por meio da **engenharia anidrobiótica** (EA). A EA se trata de um campo de estudo recente que visa tornar células e estruturas biológicas resistentes à dessecação extrema (GARCIA DE CASTRO et al., 2000).

EA é um campo de estudo versátil, apresentando possíveis aplicações em diversas áreas do conhecimento. Na medicina, elementos-chave da anidrobiose poderiam ser aplicadas no armazenamento (*i.e.*, “biobancos”), manutenção e transporte de estruturas biológicas, como células, sêmen (POLGE et al., 1949), sangue e até órgãos inteiros a seco (SARAGUSTY e LOI, 2019). Recentemente, um estudo apresentou a capacidade de preservação da enzima luciferase (Luc) no estado seco em até 372 dias, em temperatura

ambiente, no interior de células Pv11 tolerantes à dessecação (KIKUTA et al., 2017). Além disso, já foi relatado o desenvolvimento de vacinas a seco capazes de serem estocadas a temperatura ambiente (figura 4) (ALCOCK et al., 2017).

Figura 4. Vacina com tecnologia baseada em anidrobiose. (A) Imagem por microscopia eletrônica de varredura da estrutura vítrea, composta por açúcar, formando uma camada fina e estável para a preservação de amostras virais. (B) Dispositivo adaptado para a administração da vacina – em (A) contém a membrana que conserva a vacina a seco, a qual é sustentada pelos suportes (B₁ e B₂) e, posteriormente, acoplada à seringa (C). A vacina é reidratada com o fluxo de líquido que passa do recipiente da seringa até a agulha (retirado de ALCOCK et al., 2017).

No campo das ciências agrônômicas, as práticas de transformação e melhoramento de plantas, facilitadas pelas novas tecnologias de edição gênica, poderiam promover a criação de culturas que, de maneira similar à anidrobiose, expressam genes constituintes da maquinaria de reparo e manutenção celular frente às condições de estiagem. Esses avanços poderiam fornecer um grau de produtividade maior, além de gerar um maior número de empregos. (FRANÇA et al., 2007; FARRANT e MOORE, 2011). Adicionalmente, a EA aplicada a alimentos poderia viabilizar viagens espaciais de longa duração, não apenas criando alimentos que podem ser estocados a seco, mas também criando sistemas de animação suspensa (revisto em JÖNSSON, 2007; JÖNSSON et al., 2008; HORIKAWA et al., 2008).

Por fim, de forma inovadora, a EA também tem potencial para ser aplicada na biorremediação de pragas. Wilson e Sherman (2010) apresentaram a cura de um rotífero anidrobionte *Habrotrocha elusa* que tinha sido artificialmente infectado por um fungo parasita não-anidrobionte *Rotiferophthora angustipora*. Basicamente, por meio da dessecação do rotífero, o parasita não foi capaz de tolerar o ambiente isento de água em 4 semanas (WILSON e SHERMAN, 2010). Assim, a terapia não invasiva foi eficaz para

manter a viabilidade daquela população de rotíferos. Da mesma maneira, essa abordagem poderia estender sua aplicação para o controle de outras pragas agrícolas que não apresentem a capacidade de tolerar a dessecação extrema. O desenvolvimento de plantas (e outros hospedeiros) tolerantes ao estresse hídrico possibilitaria o controle de pragas, em uma maneira não invasiva, sem a aplicação de agrotóxicos.

1.2 Metalotioneínas

1.2.1 Visão geral

Em 1957, Margoshes e Vallee isolaram e caracterizaram parcialmente as Metalotioneínas (MTs) presentes em rins de cavalos, ligadas a átomos de Cádmio (Cd) (MARGOSHES e VALLEE, 1957). Desde então, mais de 20 mil artigos foram publicados, abordando aspectos em relação à estrutura, fatores bioquímicos e funcionais, mecanismos de regulação e padrões teciduais de MTs (dados obtidos via Web of Science, 2019). Ao longo dos anos, diversas tecnologias foram desenvolvidas (*e.g.*, expressão de MTs recombinantes, espectroscopia UV) e permitiram descrições mais acuradas a respeito destas proteínas.

Atualmente, sabe-se que as MTs são presentes em um amplo espectro taxonômico, de leveduras a plantas e vertebrados, e definidas universalmente como proteínas quelantes de metais, com cadeias curtas (cerca de 50 aminoácidos) e ricas em resíduos de cisteínas, os quais são responsáveis pela ligação metal-tiolato (figura 5) (revisado em CAPDEVILA e ATRIAN, 2011), que resultam em fortes interações entre estes peptídeos e íons metálicos.

Figura 5. Estrutura tridimensional da metalotioneína (MT) de leveduras. Estrutura peptídica (em branco) com seus resíduos de cisteínas (em amarelo) interagindo com átomos de Cobre (Cu) (em marrom). Fonte: SHAFEE, 2016.

Diferentes estudos já evidenciaram a atuação de MTs na ligação a metais e em processos de oxirredução (COYLE et al., 2001). Assim, as MTs possuem capacidades pleiotrópicas, como: (i) sequestro e detoxificação de metais xenobióticos (*e.g.*, Mercúrio (Hg), Cádmio (Cd)) (KLAASSEN et al., 1999; STURZENBAUM et al., 2001), (ii) manutenção de metais fisiológicos (*e.g.*, Cobre (Cu), Zinco (Zn)) (COUSINS, 1985) e (iii) proteção contra estresse oxidativo (VIARENGO et al., 2000).

A primeira evidência das MTs (MARGOSHES e VALLEE, 1957) já havia sido relatada em um contexto de (i) sequestro e detoxificação de metais xenobióticos, no caso, ligadas aos átomos de Cd (MARGOSHES e VALLEE, 1957), sugerindo seu papel protetor contra metais pesados em animais (KLAASSEN et al., 1999). Adicionalmente, outros estudos também identificaram os complexos de MTs com outros metais pesados xenobióticos e fisiológicos, tais como Cobre (Cu), Mercúrio (Hg) e Zinco (Zn) (ACHARD-JORIS et al., 2007; ZALUPS e KOROPATNICK, 2000; BLINDAUER, 2013).

1.2.2 Metalotioneínas e íons metálicos

O zinco (Zn) apresenta um papel importante na coordenação estrutural de MTs, além de manter a estrutura bidomínica de MT1 (metalotioneína-1) nos processos de

substituição de íons Zn/Ag (PALACIOS et al., 2011). Entretanto, isoformas de MTs em diferentes organismos podem apresentar dissemelhanças em suas afinidades com determinados íons. Essas especificidades iônicas diferenciais são explicadas parcialmente pela composição de cisteínas e de ‘aminoácidos não-coordenantes’ ao longo da sequência peptídica (PALACIOS et al., 2011).

Por exemplo, *C. elegans* apresenta duas isoformas, CeMT1 e CeMT2, sendo que a primeira apresenta preferência por Zn e a segunda por Cu (PALACIOS et al., 2011). Neste caso, esta diferença é devida ao número desigual de resíduos de histidina e cisteína, em que CeMT1 apresenta 4 histidinas e 19 cisteínas, enquanto CeMT2 apresenta apenas 1 histidina e 18 cisteínas (BOFILL et al., 2009). Assim, afirma-se que não apenas as cisteínas possuem papéis importantes na coordenação de íons metálicos, mas histidinas também apresentam papéis semelhantes, além de também influenciarem na especificidade de ligação a metais (PALACIOS et al., 2011).

Seus domínios α (C-terminal) e β (N-terminal) possuem alta heterogeneidade em relação aos tamanhos de suas sequências peptídicas e em seus tipos de resíduos ‘intercalantes’ (espaçadores entre as cisteínas), apresentando alta conservação apenas em suas cisteínas. Essa heterogeneidade é considerada um limitante para o desenvolvimento de análises como *buscas por homologias*, *modelagem de estruturas tridimensionais* e, portanto, *predições funcionais* de MTs (revisto em CAPDEVILA e ATRIAN, 2011).

Entretanto, sabe-se que as diferentes coordenações geométricas conferidas por diferenças nos tipos de resíduos e números de cisteínas nas MTs, levam essas proteínas a adotarem conformações estruturais distintas e, portanto, apresentarem naturezas específicas dentro de um espectro de afinidade iônica – Zn-tioneínas e Cu-tioneínas (figura 6) (PALACIOS et al., 2011).

Figura 6. Natureza gradual das propriedades de MTs de diversos organismos. Proteínas que apresentam maiores afinidades a Zn se localizam mais próximas à extremidade superior da flecha (esquerda). Proteínas que apresentam maiores afinidades a Cu se localizam mais próximas à extremidade inferior da flecha (direita). Fonte: Adaptada de PALACIOS et al., 2011.

Interessantemente, Strain e Cullota (1996) mostraram que os níveis de oxigenação intracelular interferem nos parâmetros funcionais de MTs, em que condições de anaerobiose induzem o acúmulo de íons Cu, os quais são detectados por Ace1, um gene que desencadeia a expressão de MTs em *S. cerevisiae*. Por outro lado, em aerobiose, os genes de MTs retornam ao estado não-induzido (STRAIN e CULOTTA, 1996). Adicionalmente, também foi sugerido que o nível de O₂ em um determinado microambiente é um determinante para a estrutura de MTs e, portanto, para a funcionalidade (PAGANI et al., 2007).

Considerando que organismos anidrobiontes são capazes de se manter viáveis em cenários de alta concentrações de íons metálicos e apresentam estados ametabólicos – ou seja, sem demanda de oxigênio, como mencionado anteriormente (Seção 1.1.3), levantamos a hipótese de que MTs destes organismos apresentem diferenças estruturais e, portanto, propriedades funcionais diferentes em relação a organismos não-anidrobiontes.

1.3 Gálio

Em 1875, o químico francês Paul Emile Lecoq de Boisbaudran analisava amostras de esfarelita (*i.e.*, o principal minério de zinco) por meio de técnicas espectroscopia e, então, descobriu o elemento Gálio (Ga) (LECOQ DE BOISBAUDRAN, 1875) – nomeado por ele em homenagem à sua terra natal, *Gallia*.

Com a aparência azul prateada, Ga se trata de um metal (figura 7) de pós-transição, pertencente ao grupo 13 da tabela periódica. Assim, compartilha muitas características físico-químicas semelhantes a outros metais do grupo, como Alumínio (Al), Índio (In) e Tálho (Tl). Porém, de maneira particular, Ga apresenta uma baixa temperatura de fusão (29,76°C) em relação a outros metais pesados (JEFFERSON LAB, 2003).

Figura 7. Gálio (Ga) em estado sólido sob temperatura ambiente. Fonte: <https://images-of-elements.com/gallium.php>.

Essa particularidade possibilitou diferentes aplicações tecnológicas do metal Ga: construções de semicondutores com Arsenieto de Gálio (GaAs) e/ou Nitreto de Gálio (GaN) (FRENZEL et al., 2016); telescópio detector de neutrinos (ABDURASHITOV et al., 1996); termômetro de altas temperaturas – devido à alta temperatura de ebulição (2.204°C) (FRENZEL et al., 2016). Naturalmente, Ga não apresenta função biológica conhecida, mas existem estudos clínicos envolvendo o uso do metal para o diagnóstico de linfoma (FRONT et al., 1995), detecção de tumores por meio do isótopo Ga-68 (KHAN et al., 2009) e ações antimicrobianas (KELSON et al., 2013).

Em geral, dependendo da temperatura do material, ligas metálicas compostas por diferentes elementos (*e.g.*, ferro, magnésio) apresentam baixos valores de coeficiente de

difusão de gases como hidrogênio (H) (SMITHELLS e RANSLEY, 1935; SZKLARSKA-SMIALOWSKA e XIA, 1997). Outra particularidade de Ga, é a formação de um revestimento fino de óxido em sua superfície externa quando em contato à umidade, sendo oxidado lentamente (MOSKALYK, 2003). Além disso, Ga possui valores inferiores de energia de ligação adsorvato-metal (para átomos de H e O e para o grupo -OH) em comparação ao metal Índio (In) (NAZMUTDINOV e ZINKICHEVA, 2004).

As particularidades físico-químicas do metal Ga fazem desse um material interessante para estudos sobre os limites da resiliência anidrobiótica frente a uma condição inovadora de estresse duplo – alta concentração de metal pesado e baixas quantidades de oxigênio no interior do metal. Visto que o nematoide anidrobiótico *P. superbis* em estado seco é tolerante a temperaturas maiores que 50°C (de SOUZA, 2017), a temperatura de fusão do metal é insuficiente para afetar sua viabilidade. Assim, levantamos a hipótese de que o nematoide *P. superbis* tolera a imersão completa em blocos de Ga líquido devido ao papel protetor da anidrobiose.

2. Hipótese

2.1 Hipótese do trabalho

Considerando a natureza ametabólica da anidrobiose e a tolerância de organismos anidrobiontes a altas concentrações de íons metálicos em solos secos, levantamos a hipótese de que o nematoide anidrobiótico *P. superbus*, em seu estado seco, tolera a imersão completa em blocos de metal Gálio líquido por 7 dias.

Adicionalmente, levantamos a hipótese de que metalotioneínas (MTs) de organismos anidrobiontes apresentem diferenças estruturais em comparação com MTs de organismos não-anidrobiontes.

3. Objetivos

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivos gerais

Investigar a tolerância do nematoide *P. superbus* em matriz metálica de Ga 99.99% por 7 dias e entender a relevância de MT em cenários de dessecação extrema, buscando similaridades e diferenças estruturais entre organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes.

3.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade e o crescimento populacional de *P. superbus* após sete dias de imersão em Gálio líquido 99.99%;
- Identificar diferenças na composição de cisteínas de MTs de anidrobiontes e não-anidrobiontes;
- Identificar eventuais diferenças estruturais primárias e terciárias de MTs de espécies anidrobiontes e não-anidrobiontes;
- Criar modelos tridimensionais de MTs de organismos procariontes e buscar por eventuais diferenças estruturais entre anidrobiontes e não-anidrobiontes;
- Investigar a interação entre MTs de anidrobiontes e não-anidrobiontes a íons metálicos.

4. Material e Métodos

4.1 Manutenção de nematoides

Populações de *P. superbis* foram mantidas em placas de Petri contendo meio de cultivo NGM (*Nematode Growth Medium*) ágar com uma camada de bactérias *Escherichia coli* (linhagem OP50) para alimentação, a 15°C no escuro.

4.2 Sincronização das populações de nematoides

Culturas mistas de nematoides (*i.e.*, contendo indivíduos em todas as etapas do ciclo de vida) são coletadas de placas de NGM por meio do enxágue com tampão M9 e lavagens (3x) subsequentes para a retirada do excesso de bactérias. Cada lavagem ocorre em um período de 10 minutos, contando com a decantação dos vermes e ovos em temperatura ambiente, retirada do sobrenadante e adição de um volume de M9 (10-15 mL).

Após a lavagem, as populações são expostas a uma solução de *bleaching* (1M NaOH e 0,1% NaClO) por um período entre 7 e 9 minutos (até a desintegração das formas larvais e adulta), com agitação em aparelho *vortex* a cada minuto. Após este período, os vermes são completamente desintegrados, sobrando apenas ovos. Em seguida, a solução é centrifugada a 2.325 x g e o sobrenadante é retirado, sendo substituído por 5 mL de H₂O destilada. Para diminuir a concentração da solução de *bleaching*, o processo de lavagem é repetido três vezes.

Por fim, os ovos restantes nos tubos são transferidos para placas contendo meio de cultivo NGM e, subsequentemente, incubados a 20°C no escuro. Nestas condições, após 48 h obtém-se uma população homogênea (sincronizada) de larvas L2 de *P. superbis* (EVANGELISTA, 2011; GUIDELLI, 2011).

4.3 Ensaio de dessecação

Populações sincronizadas de nematoides são coletadas de placas de NGM e lavadas, como já descrito anteriormente, com tampão M9. As larvas são imobilizadas em

membranas Supor 0,45 μm (Sigma-Aldrich, Z269255) com a sucção de um funil de Sartório. Posteriormente, as membranas são depositadas em microtubos de 1,5 mL, o quais são mantidos sob diferentes umidades relativas (UR) com intervalos de 24 h a 20°C.

Primeiramente, os tubos são submetidos à etapa de ‘pré-dessecação’, a qual ocorre em uma câmara selada contendo uma solução concentrada de CuSO_4 em 98% UR. Em seguida, a segunda etapa - ‘dessecação total’ - ocorre em uma câmara selada com sílica gel com 10% UR. A terceira - ‘pré-reidratação’ - ocorre em câmara selada contendo água destilada, conferindo uma condição próxima de 99% UR. Por fim, na etapa final - ‘reidratação’ - as membranas são mergulhadas em tampão M9 por 1 hora.

4.4 Imersão em matriz de Gálio

Para o experimento de Ga, cerca de 600 larvas L2 de *P. superbus* foram imobilizadas e dessecadas em membranas (*i.e.*, 3 membranas, cada uma contendo 200 vermes) as quais, posteriormente, foram submetidas à imersão em matriz de Ga.

Tampas de microtubos de 1,5 mL foram utilizadas como recipientes para a matriz metálica e seus nematoides. Primeiramente, o metal Ga 99.99% (Sigma-Aldrich, 263265) foi derretido a 50°C durante 15 minutos em banho seco. Em seu estado líquido, 100 μL foram adicionados às tampas e a sua solidificação (dentro das tampas) foi realizada em placas seladas contendo sílica gel, em temperatura ambiente, para a formação de um “filme” de Ga nas paredes do recipiente. Uma vez que as tampas estão com metal solidificado, as membranas contendo vermes dessecados são depositadas no interior das tampas. Por fim, para cobrir totalmente as membranas, foram adicionados 180 μL de Ga líquido (figura 8).

Figura 8. Blocos de metal Ga envolvendo nematoides. (A) fotografia da tampa de microtubo com metal Ga solidificado contendo cerca de 600 nematoides em seu interior. (B) representação gráfica do bloco de Ga sólido (cinza) e a membrana (branco) contendo vermes (riscos cinzas) em seu interior.

Dessa forma, foram criados os grupos experimentais: controle negativo 1 (CN1) – membranas com vermes dessecados, na ausência de Ga; tratamento gálio 1 (TG1) – membranas com vermes dessecados e cobertos por Ga; controle hidratado 1 (CH1) – membranas com vermes hidratados e cobertos por Ga; controle negativo 2 (CN2) – membranas com vermes dessecados, na ausência de Ga; tratamento gálio 2 (TG2) – membranas com vermes dessecados e cobertos por Ga.

Para verificar a capacidade do metal Ga em bloquear a umidade externa e, portanto, impedir a reidratação dos vermes, os grupos experimentais foram submetidos a diferentes condições de UR: CN1 e TG1 em 10% UR e CH1, CN2 e TG2 em 99% UR. Assim, as amostras foram mantidas nessas condições durante sete dias a 20°C, no escuro.

4.5 Ensaio de viabilidade

A determinação da viabilidade foi realizada por meio da coloração com Eritrosina B em tampão M9 (0,4% m/v) durante o período de 1 hora. Após esse período, são realizadas lavagens para a retirada do excesso de corante até a solução ficar translúcida, permitindo a detecção dos vermes corados e não-corados (apêndice A). A morte dos indivíduos promove a perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática de suas células, facilitando a entrada do corante. Portanto, o cálculo da viabilidade é definido pela razão do número de vermes vivos (não-corados) pelo número total de vermes da amostra.

4.6 Ensaio de crescimento populacional

O crescimento populacional foi calculado em 20 e 40 dias após os tratamentos em blocos de Ga, dos quais os vermes foram retirados e depositados em placas contendo NGM e bactéria OP50 mantidas a 20°C, no escuro. A razão de crescimento é determinada a partir da quantidade de vermes (após 20 e 40 dias) dividido pela quantidade inicial de vermes nas mesmas placas de cultivo. Adicionalmente, o número final (*output*) é multiplicado pela respectiva viabilidade da população (calculada como descrito anteriormente), assim como o número inicial (*input*) é multiplicado pela viabilidade logo após os tratamentos. Sendo assim, o cálculo consiste em:

$$\text{Crescimento populacional} = \frac{(\text{output} \times \text{viabilidade final})}{(\text{input} \times \text{viabilidade inicial})}$$

4.7 Análise estatística

Os experimentos relacionados à imersão de *P. superbus* em Ga foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas para a geração das médias e desvios-padrão. Foram realizados testes T de Student para a comparação entre dois tratamentos. Quando mais de dois tratamentos foram analisados de maneira simultânea, utilizou-se o teste ANOVA (análise de variância) com teste de Tukey a posteriori. Para todos os casos, as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

4.8 Análises *in silico*

4.8.1 Obtenção de sequências de MTs

Devido à alta heterogeneidade de sequências primárias de MTs, a busca de suas sequências para diferentes organismos via BLAST e suas variações (*i.e.*, tBLASTn, BLASTp e BLASTx) não é eficaz. No entanto, tais sequências foram obtidas nos bancos de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e UniProt via busca por “nome” (ou palavra-chave).

Para que as comparações entre metalotioneínas sejam menos propensas ao erro, as sequências estudadas são taxonomicamente equivalentes entre os grupos de anidrobiontes e não-anidrobiontes. Sendo assim, para cada grupo (anidrobionte e não-anidrobionte) foram utilizadas cinco sequências de cianobactérias, duas de plantas, uma de fungo e duas de animais (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Sequências de MTs de organismos não-anidrobiontes

Não-anidrobiontes			
Reino	Espécie	Identidade	ID NCBI
Monera	<i>Pleurocapsa</i> sp.	Metallothionein	WP_106233697.1
	<i>Hydrococcus rivularis</i>	Metallothionein	WP_071880655.1
	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	Metallothionein family 14	WP_015194236.1
	<i>Xenococcus</i> sp.	Prokaryotic metallothionein	WP_006510504.1
	<i>Hyella patelloides</i>	Metallothionein	WP_144871348.1
Plantae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant EC metallothionein-like protein	NP_179905.1
	<i>Zea mays</i>	Metallothionein-like protein 2C	AQK95514.1
Fungi	<i>Candida glabrata</i>	Uncharacterized protein CAGL0D01265q	XP_002999527.1
Animalia	<i>Trichinella pseudospiralis</i>	Metallothionein-like protein 4A, partial	KRY62694.1
	<i>Daphnia magna</i>	Metallothionein A	AGY30891.1

Tabela 2 – Sequências de MTs de organismos anidrobiontes

Anidrobiontes			
Reino	Espécie	Identidade	ID NCBI
Monera	<i>Nostoc</i> sp.	Prokaryotic metallothionein	WP_015138883.1
	<i>Tolypothrix</i> sp.	Metallothionein	WP_089127748.1
	<i>Lyngbya</i> sp.	Metallothionein	WP_009785736.1
	<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	Metallothionein family 14	AFY89611.1
	<i>Anabaena cylindrica</i>	Metallothionein	WP_081593752.1
Plantae	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Metallothionein	AAB61212.1
	<i>Dorcoceras hygrometricum</i>	Metallothionein-like protein	KZV14094.1
Fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Metallothionein	CAA40884.1
Animalia	<i>Artemia franciscana</i>	Metallothionein	ABE02257.1
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Metallothionein-1	NP_504696.1

4.8.2 Análise da composição de cisteínas

Uma vez que as sequências de metalotioneínas foram obtidas, suas composições em termos de resíduos de aminoácidos foram analisadas por meio do *software* Gene Runner (SPRUYT e BUQUICCHIO, 1994). O programa permite analisar o percentual de cada aminoácido para cada proteína. Neste sentido, foi realizada a análise do percentual de cisteínas para cada proteína.

4.8.3 Alinhamento múltiplo de sequências

Os alinhamentos de sequências FASTA de metalotioneínas foram realizados no *software* online Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) (SIEVERS et al., 2011; MCWILLIAN et al., 2013; LI et al., 2015). A visualização dos resultados foi feita no *software* JalView (CLAMP et al., 1998), com o limiar de identidade residual ajustado para 100% para os alinhamentos (de maneira separada) entre sequências procarióticas e eucarióticas, e 80% para o alinhamento (geral) entre sequências de todas as espécies utilizadas no estudo.

4.8.4 Análise de estruturas terciárias

Estruturas tridimensionais de MTs foram adquiridas por meio da busca no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*). Tais estruturas foram sobrepostas (*i.e.*, alinhadas) utilizando o *software* PyMOL (DELANO, 2002) para o cálculo de RMSD (*root mean square deviation*) em ângström (Å) – quanto menor o valor de RMSD, mais similares são as estruturas sobrepostas.

Buscando identificar similaridades entre estruturas de MTs não-anidrobióticas, foram sobrepostas 2 cadeias- α de organismos não-anidrobiontes filogeneticamente próximos: 2 mamíferos e 2 bactérias (Tabela 3). Por outro lado, para a identificação de diferenças estruturais entre MTs não-anidrobióticas e anidrobióticas, foram sobrepostas 2 cadeias- α de dois fungos filogeneticamente próximos, um anidrobioto e outro não-anidrobioto.

Tabela 3 – Estruturas terciárias de MTs

Sobreposição	Reino	Natureza	Organismo	PDB ID
1	Animalia	Não-anidrobiótica	<i>Homo sapiens</i>	2MRT
			<i>Rattus norvegicus</i>	2MHU
2	Monera	Não-anidrobiótica	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6GW8
			<i>Synechococcus elongatus</i>	1JJD
3	Fungi	Não-anidrobiótica	<i>Neurospora crassa</i>	1T2Y
		Anidrobiótica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1AQR

4.8.5 Modelagem estrutural de MTs

A modelagem *ab initio* das estruturas tridimensionais de MTs foi realizada via I-TASSER (ZHANG, 2008), utilizando as sequências primárias anteriormente obtidas (Seção 4.8.1). O servidor I-TASSER possibilitou (i) criar modelos tridimensionais, (ii) identificar estruturas análogas no PDB e (iii) visualizar os resíduos ligantes a íons metálicos. Os graus de confiança das predições dos modelos tridimensionais e dos resíduos ligantes a metais são arbitrados pelo valor de C-score [0-1] – quanto maior o C-score, mais confiável é a predição. O grau de similaridade entre os modelos preditos e

suas estruturas análogas do PDB são considerados por valores de RMSD inferiores a 3.0 Å resultantes dos alinhamentos de estruturas via PyMOL.

Buscando identificar diferenças estruturais entre os modelos tridimensionais de anidrobiontes e não-anidrobiontes (gerados pelo I-TASSER), todos estes foram sobrepostos entre si, via PyMOL, e também arbitrados por valores de RMSD inferiores a 3.0 Å (similares). Para isto, foram utilizadas apenas sequências de MTs procarióticas devido à proximidade filogenética entre as mesmas, uma vez que todas estas são de cianobactérias. Sendo assim, sequências de MTs eucarióticas foram retiradas da modelagem devido à divergência filogenética entre as mesmas.

Para confirmar a proximidade filogenética entre as cianobactérias, utilizando suas sequências de DNA ribossomal (rDNA) foi construída uma árvore filogenética pelo método de agrupamento UPGMA (do inglês, *unweighted pair group with arithmetic mean*) via MEGA7 (KUMAR et al., 2016).

5. Resultados

5.1 Análises *in silico*

5.1.1 Análise da composição de cisteínas

O gráfico da figura 9 apresenta o percentual de cisteínas presentes em MTs de organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes para os seguintes grupos: eucariontes (*i.e.*, animais, fungos e plantas), procariontes (bactérias) e geral (eucariontes e procariontes).

Figura 9. Conteúdo de cisteínas em MTs. O percentual de resíduos de cisteínas em MTs são representados em barras escuras (não-anidrobiontes) e claras (anidrobiontes). O asterisco representa diferença significativa ($p < 0.05$).

5.1.2 Alinhamento múltiplo de sequências

As figuras 11, 12 e 13 mostram os alinhamentos de MTs realizados via Clustal Omega com cortes de identidade residual de 100% entre sequências do mesmo grupo (eucariontes VS. eucariontes; procariontes VS. procariontes) (figuras 10 e 11) e 80% entre grupos (eucariontes + procariontes VS. eucariontes + procariontes) (figura 12).

Figura 10. Sequências primárias de MTs procarióticas. Visualização via JalView dos alinhamentos múltiplos de sequências de organismos não-anidrobiontes em (A) e anidrobiontes em (B) com identidade de resíduos ajustada para 100%. Todos os resíduos destacados em diferentes cores representam aqueles que são conservados em 100% das espécies.

Figura 11. Sequências primárias de MTs eucarióticas. Visualização via Jalview dos alinhamentos múltiplos de sequências de organismos não-anidrobiontes em (A) e anidrobiontes em (B) com identidade de resíduos destacados para 100%. Os resíduos destacados representam aqueles que são conservados em 100% das espécies.

Figura 12. Sequências primárias de MTs procarionóticas e eucarióticas. Visualização via JalView dos alinhamentos múltiplos de sequências de organismos não-anidrobiontes em (A) e anidrobiontes em (B) com identidade de resíduos ajustada para 80%. Os resíduos destacados em vermelho representam aqueles que são conservados em 100% das espécies.

5.1.3 Análise de estruturas terciárias

Os alinhamentos das estruturas de cadeias- α de MTs entre mamíferos (2MRT:2MHU) e bactérias (6GW8:1JJD) não-anidrobiontes resultaram em valores de RMSD de 2.462 Å e 2.303 Å, respectivamente (figuras 13 e 14).

Figura 13. Alinhamentos de estruturas terciárias (A) e primárias (B) de cadeias- α de MTs de mamíferos não-anidrobiontes. **Legenda:** Cadeias- α de MT de *H. sapiens* (PDB ID: 2MRT) (magenta) e de *R. norvegicus* (PDB ID: 2MHU) (verde) ligados a átomos de cádmio (Cd) (esferas).

Figura 14. Alinhamentos de estruturas terciárias (A) e primárias (B) de cadeias- α de MT de bactérias não-anidrobiontes. **Legenda:** Cadeias- α de MT de *P. fluorescens* (PDB ID: 6GW8) e de *S. elongatus* (PDB ID: 1JJD) (verde) ligados a átomos de cobre (Cu) (esferas).

Na figura 15, o alinhamento entre MTs de um fungo não-anidrobionte e outro fungo anidrobionte (1T2Y:1AQR) resultou em um RMSD de 5.308 Å e uma região de *gap* no alinhamento das estruturas primárias correspondentes (figura 15).

Figura 15. Alinhamentos de estruturas terciárias (A) e primárias (B) de cadeias- α de MT de fungos não-anidrobionte e anidrobionte. **Legenda:** Cadeias- α de MT de *N. crassa* (não-anidrobionte) (PDB ID: 1T2Y) e de *S. cerevisiae* (anidrobionte) (PDB ID: 1AQR) (vermelho) ligados a átomos de cobre (Cu) (esferas).

5.1.4 Modelagem estrutural de MTs

O servidor I-TASSER realizou modelagens estruturais para todas as proteínas bacterianas (anidrobiontes e não-anidrobiontes) envolvidas no estudo. Todos os modelos obtiveram valores de RMSD inferiores ou iguais a 3.0 Å, porém, com valores de C-score entre 0.31 e 0.76 (figuras 16 e 17).

Figura 16. Estruturas tridimensionais de MTs de cianobactérias não-anidrobiontes. Os modelos gerados via I-TASSER são apresentados na seguinte forma: A – *Pleurocapsa* sp. (C-score = 0.76; RMSD = 1.5 ± 1.4 Å); B – *Hydrococcus rivularis* (C-score = 0.75; RMSD = 1.5 ± 1.3 Å); C – *Stanieria cyanosphaera* (C-score = 0.31; RMSD = 2.2 ± 1.7 Å); D – *Xenococcus* sp. (C-score = 0.48; RMSD = 2.0 ± 1.6 Å); E – *Hyella patelloides* (C-score = 0.45; RMSD = 2.0 ± 1.6 Å).

Figura 17. Estruturas tridimensionais de MTs de cianobactérias anidrobiontes. Os modelos gerados via I-TASSER são apresentados na seguinte forma: A – *Nostoc* sp. (C-score = 0.68; RMSD = 1.5 ± 1.4 Å); B – *Tolypothrix* sp. (C-score = 0.71; RMSD = 1.5 ± 1.4 Å); C – *Lyngbya* sp. (C-score = 0.53; RMSD = 1.9 ± 1.5 Å); D – *Chroococcidiopsis thermalis* (C-score = 0.38; RMSD = 1.6 ± 1.4 Å); E – *Anabaena cylindrica* (C-score = 0.36; RMSD = 1.6 ± 1.4 Å).

A árvore filogenética construída para as espécies de cianobactérias utilizadas no estudo não apresentou distâncias evolutivas significantes entre si (figura 18). As sobreposições entre os modelos gerados para estas também resultaram em valores inferiores a 3.0 Å (figura 19).

Figura 18. Árvore filogenética de cianobactérias. Os valores das distâncias evolutivas entre as espécies de cianobactérias anidrobiontes e não-anidrobiontes revelam a proximidade entre ambas.

	C. thermalis	H. rivularis	H. patelloides	Lyngbya sp.	Nostoc sp.	Pleurocapsa sp.	S. cyanosphaera	Tolypothrix sp.	Xenococcus sp.
A. cylindrica	0.990	1.226	1.585	1.053	1.317	1.028	0.819	1.023	0.969
C. thermalis		1.434	1.570	1.168	1.444	1.153	1.047	1.131	1.005
H. rivularis			1.493	1.241	1.227	1.295	1.161	1.233	1.151
H. patelloides				1.157	1.637	1.120	1.228	1.398	0.935
Lyngbya sp.					0.974	0.878	0.963	0.971	0.643
Nostoc sp.						1.289	1.126	1.105	0.988
Pleurocapsa sp.							1.066	1.058	0.777
S. cyanosphaera								0.892	0.588
Tolypothrix sp.									0.847

Figura 19. Resultados de alinhamentos entre modelos de MTs de cianobactérias. Os valores de RMSD (Å) representam as diferenças estruturais entre os modelos (gerados via I-TASSER) alinhados. Valores maiores do que 3 Å correspondem a alinhamentos entre proteínas estruturalmente diferentes.

Nas tabelas 4 (não-anidrobiontes) e 5 (anidrobiontes) são apresentadas as estruturas (já depositadas no PDB) que foram identificadas como análogas às estruturas de MTs procarióticas. Nota-se que os códigos de identificação do PDB (PDB ID) das estruturas análogas são 6GRV e 1JJD.

Tabela 4 – Estruturas análogas no PDB - não-anidrobiontes

Espécie	RMSD (Å)	
	6GRV	1JJD
<i>Pleurocapsa</i> sp.	1.14	1.34
<i>H. rivularis</i>	1.5	1.11
<i>S. cyanosphaera</i>	1.03	1.34
<i>Xenococcus</i> sp.	1.08	1.46
<i>H. patelloides</i>	1.31	1.34

Tabela 5 – Estruturas análogas no PDB - anidrobiontes

Espécie	RMSD (Å)	
	6GRV	1JJD
<i>A. cylindrica</i>	0.97	1.19
<i>C. thermalis</i>	0.89	1.4
<i>Lyngbya</i> sp.	1.07	1.37
<i>Tolypothrix</i> sp.	1.27	1.14
<i>Nostoc</i> sp.	1.15	1.34

As tabelas 6 (não-anidrobiontes) e 7 (anidrobiontes) apresentam quais e quantos resíduos de MTs procarióticas se ligam a íons Zn – o único íon predito para a interação com as sequências utilizadas no estudo.

Tabela 6 – Interações de MTs não-anidrobióticas e Zn

Espécie	C-score	Resíduos ligantes a Zn
<i>Pleurocapsa</i> sp.	0.79	9, 14, 32, 36
<i>H. rivularis</i>	0.81	9, 14, 32, 36
<i>S. cyanosphaera</i>	0.96	9, 14, 32, 36
<i>Xenococcus</i> sp.	0.80	11, 16, 34, 38
<i>H. patelloides</i>	0.80	9, 14, 32, 36

Tabela 7 – Interações de MTs anidrobióticas e Zn

Espécie	C-score	Resíduos ligantes a Zn
<i>A. cylindrica</i>	0.77	9, 14, 32, 36
<i>C. thermalis</i>	0.93	9, 11, 14, 32, 36
<i>Lyngbya</i> sp.	0.82	9, 14, 32, 36
<i>Tolypothrix</i> sp.	0.79	9, 14, 32, 36
<i>Nostoc</i> sp.	0.80	9, 14, 32, 36

5.2 Imersão de *P. superbis* em matriz de Gálio

5.2.1 Viabilidade

Na figura 16, os percentuais de sobrevivência são apresentados para os diferentes grupos de larvas L2 de *P. superbis*. De forma notável, os vermes dessecados que foram completamente submersos em Ga a 10% UR (GT1) não apresentaram diferenças significativas na sobrevivência em comparação com o controle (NC1). O grupo experimental mantido a 100% UR (GT2) (66%) apresentou percentuais de sobrevivência diferencialmente superiores em relação ao seu controle NC2 (31%), mas estatisticamente equivalentes aos grupos NC1 e GT1 (73% e 72%, respectivamente). Por fim, o grupo hidratado (HC1) não apresentou quaisquer sinais de sobrevivência (0%) após a imersão em Ga por 7 dias (figura 20).

Figura 20. Viabilidade de *P. superbis*. Os percentuais de sobrevivência são representados (eixo y) para cada grupo (eixo x). As diferentes letras representam diferenças significativas ($p < 0.05$).

5.2.2 Crescimento populacional

De maneira similar aos resultados de sobrevivência, os valores de crescimento populacional para NC1, GT1 e GT2 não diferem de maneira significativa ao longo de 40 dias após a imersão em Ga (taxas de crescimento de 58,8, 55,6 e 63,9 vezes no dia 40, respectivamente) (figura 21). Em 20 e 40 dias, o grupo NC2 apresentou diferenças significativas em sua taxa de crescimento inferior (15,3 vezes no dia 40), comparando com todos os grupos experimentais. Como esperado, não foi observado crescimento populacional para o grupo HC1.

Figura 21. Crescimento populacional de *P. superbis*. A razão output/input é representada (eixo y) para cada grupo em períodos de 20 e 40 dias (eixo x) após os tratamentos. As diferentes letras representam diferenças significativas ($p < 0.05$).

6. Discussão

6.1 Análises *in silico* de MTs

A abordagem computacional e comparativa sobre as MTs de organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes é original, uma vez que esta não fora encontrada em outros trabalhos na literatura científica. Infelizmente, um dos problemas para esta abordagem foi a dificuldade de encontrar sequências primárias de MTs para organismos anidrobiontes e, portanto, o número de sequências para os diferentes grupos limitou as análises a baixos poderes estatísticos.

Sequências primárias de MTs apresentam altas proporções de cisteínas, consistindo em 15-30% dos aminoácidos totais da proteína (BLINDAUER e LESZCZYSZYN, 2010). De forma corroborativa, a análise da composição de cisteínas das sequências utilizadas neste estudo apresentou percentuais entre 16 e 23% dos aminoácidos totais. Adicionalmente, o gráfico da figura 9 apresentou diferença significativa entre as médias dos percentuais de cisteínas em MTs de não-anidrobiontes e anidrobiontes apenas para o grupo de ‘procariontes’ – com valor superior para não-anidrobiontes. De forma similar, porém sem diferença significativa, também foi apresentada uma tendência de valores superiores nos percentuais de cisteínas em MTs de organismos não-anidrobiontes para os grupos de ‘eucariontes’ e ‘geral’.

MTs de cianobactérias são classificadas dentro da família 14 de MTs (BINZ E KÄGI, 1999), conhecida como BmtA, incluindo sequências primárias altamente conservadas. Neste sentido, a conservação apresentada no alinhamento entre procariontes (figura 11) é explicada devido à proximidade filogenética das cianobactérias amostradas.

Por outro lado, o alinhamento entre MTs eucarióticas (figura 12) apresentou um baixo grau de conservação geral entre as espécies, exibindo conservação apenas em alguns resíduos de cisteínas. Visto que o alinhamento de MTs eucarióticas envolveu sequências de diferentes reinos biológicos (Animalia, Fungi e Plantae), a heterogeneidade de resíduos é, de certa forma, esperada. De acordo com a classificação evolutiva de MTs feita por Binz e Kägi (1999), as sequências utilizadas no alinhamento da figura 12 envolvem MTs de diferentes famílias: famílias 3 (crustáceos), 6 (nematoides), 9 (*C. glabrata*), 13 (*S. cerevisiae*) e 15 (plantas) (BINZ E KÄGI, 1999).

Em geral, o número de cisteínas conservadas nos alinhamentos de sequências primárias (figuras 10, 11 e 12) mostrou-se superior em organismos não-anidrobiontes, em

relação a anidrobiontes. Assim, tanto a *composição de cisteínas* quanto os *alinhamentos múltiplos de MTs* sugerem que o número de cisteínas conservadas ou seu percentual em MTs não sejam fatores determinantes para a sobrevivência das espécies em ambientes secos com altas concentrações de íons metálicos.

Os alinhamentos entre estruturas tridimensionais (figura 13 e 14) de mamíferos e de bactérias não-anidrobiontes, sugerem que suas cadeias- α de MTs são, de fato, similares entre si e, portanto, atuam de maneiras fisiologicamente parecidas em um contexto celular. Em contraste, de acordo com os valores superiores de RMSD, este grau de similaridade não foi apresentado no alinhamento entre cadeias- α dos fungos *N. crassa* (não-anidrobionte) e *S. cerevisiae* (anidrobionte) (figura 15). Além disso, o alinhamento das estruturas primárias das cadeias- α de MTs destes fungos apresentou diferenças de tamanhos e resíduos, resultando em *gaps*.

As estruturas 1T2Y (*N. crassa*) e 1AQR (*S. cerevisiae*) foram construídas com diferentes números de átomos de cobre coordenados. Embora este detalhe possa trazer suspeitas sobre as diferenças entre as estruturas, um alinhamento entre duas MTs (AQQ e AQR) de *S. cerevisiae* coordenadas por diferentes átomos resulta em um RMSD de 2.487 (apêndice B), portanto, não justificando as diferenças entre 1T2Y e 1AQR. Adicionalmente, embora *N. crassa* e *S. cerevisiae* possuam distâncias evolutivas menores do que as bactérias *S. elongatus* e *P. fluorescens* (que possuem MTs consideravelmente similares), ainda apresentam diferenças nítidas em suas estruturas primárias. Enquanto 1T2Y apresenta um único domínio contendo 25 resíduos (LERCH, 1980), 1AQR apresenta a cadeia contendo 40 aminoácidos (incluindo um resíduo de histidina) (PETERSON et al., 1996).

Com base nesses dados, apresentamos evidências que sugerem as diferenças estruturais entre MTs de fungos anidrobiontes e não-anidrobiontes. Todavia, as análises que visam identificar diferenças estruturais associadas à natureza anidrobiótica só podem ser amplamente validadas a partir do surgimento de novos dados (outras estruturas 3D) sobre MTs. Assim, uma vez que novas estruturas representativas são depositadas no PDB, podemos utilizá-las para futuras análises estatisticamente mais relevantes.

Atualmente, uma forma de contornar a escassez de estruturas tridimensionais cristalizadas é a modelagem molecular. Entretanto, de forma particular, a modelagem de MTs é problemática, visto que estas dificilmente apresentam suas estruturas terciárias em

suas formas *apo* (*i.e.*, isentas de metais coordenados em suas estruturas) (CAPDEVILA e ATRIAN, 2011). Assim, tentativas de modelagem estrutural de MTs podem resultar em diferentes conformações estruturais e dificultar a predição funcional destes peptídeos.

Todavia, considerando o elevado grau de conservação entre as MTs de procariontes (figura 11), obtivemos modelos estruturais de apo-MTs (figuras 16 e 17) que, devido aos baixos valores de RMSD resultantes dos alinhamentos com estruturas representativas do PDB (*i.e.*, 6GRV e 1JJD) (BLINDAUER et al., 2001; HABJANIC et al., 2018), sugerimos que a modelagem *ab initio* via I-TASSER gerou modelos semelhantes às estruturas bem validadas do PDB, construídas por ressonância magnética nuclear. Adicionalmente, de acordo com os resultados de RMSD resultantes dos alinhamentos destes modelos entre organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes (figura 18), sugerimos que não há diferenças significativas entre as estruturas de MTs destes grupos.

A respeito das interações peptídeo-íon, MTs são conhecidas pela alta afinidade com íon Zn (CAPDEVILA e ATRIAN, 2011). Normalmente, em MTs de cianobactérias, os resíduos ligantes de Zn mais conservados são Cys9, Cys14, Cys32 e Cys36 (BLINDAUER, 2011). De forma corroborativa, todos os nossos modelos gerados via I-TASSER apresentaram interações unicamente entre estes mesmos resíduos com íon Zn, em exceção para os organismos não-anidrobionte *Xenococcus* sp. e anidrobionte *C. thermalis*. Dessa forma, é sugerido que as funções biológicas dos modelos construídos são, de fato, similares às MTs. Adicionalmente, também sugerimos de que não há diferenças relacionadas à natureza anidrobiótica na coordenação de íons metálicos.

Em suma, considerando todos os resultados das diferentes análises que buscaram correlacionar diferentes aspectos de MTs com a natureza anidrobiótica, sugerimos que a atuação na detoxificação de íons metálicos em ambientes salinos e secos pode não estar relacionada a diferenças estruturais destas proteínas, mas a níveis de expressão gênica em condições ambientais correspondentes.

Diversos estudos de expressão gênica em plantas revelaram a indução da expressão de MTs quando estes organismos se encontram em condições de seca, salinidade, estresses alcalino e oxidativo (NISHIUCHI et al., 2007; YANG et al., 2011; MEKAWY et al., 2018; JIN et al., 2017). Como exemplo, um destes estudos mostrou que a expressão de *OsMT-3* em arroz é potencialmente 2 vezes maior em um cenário de

estresse iônico (CdCl_2 e CuSO_4) e salino (NaCl) (MEKAWY et al., 2018). Além disso, estes genes de MTs induzidos foram clonados e expressos em leveduras transgênicas, resultando no aprimoramento de suas tolerâncias a metais pesados e estresses hídrico e oxidativo (NISHIUCHI et al., 2007; YANG et al., 2011; JIN et al., 2017).

Adicionalmente, um estudo do transcriptoma de *C. elegans* por RNA-Seq, evidenciou níveis de expressão diferencial temporal de *mtl-1* (*metallothionein-like 1*) entre as etapas de desenvolvimento (*i.e.*, embrionário, larvais L1, L2, L3, L4, adulto e *dauer*). De forma intrigante, foi observada uma expressão de *mtl-1* 60 vezes maior no estágio *dauer* (anexo B) (HASHIMSHONY et al., 2015) – o único estágio de desenvolvimento em que o nematoide *C. elegans* é capaz de adentrar ao processo de anidrobiose e, portanto, tolerar estresses hídricos e oxidativos (ERKUT et al., 2011) – em relação aos outros estágios de desenvolvimento.

Inicialmente, conjecturamos sobre a possibilidade do aumento no número de cisteínas em MTs de organismos anidrobiontes e suas melhorias na tolerância ao excesso de íons metálicos em cenários de dessecação extrema – o que não foi apresentado neste trabalho. Visto que diversas evidências esclarecem a expressão diferencial de MTs em condições de estresse hídrico e desbalanço osmótico, sugerimos que a melhor e mais provável via adaptativa não seria a seleção de organismos que apresentem polimorfismos em suas MTs, mas daqueles que são capazes de modular a expressão dos genes codificadores de MTs em contextos desafiadores para a sobrevivência. De tal forma que é mais provável a indução espaço-temporal da expressão gênica, levando a níveis dobrados de transcritos, do que a inserção de um número duas vezes maior de cisteínas nas cadeias peptídicas – ou até mesmo a duplicação de genes codificadores de MTs.

6.2 Imersão de *P. superbis* em matriz de Gálio

De acordo com estudos anteriores, Ga pode interferir em processos biológicos vitais dependentes de Ferro (Fe), tais como ciclos de oxirredução em bactérias (revisto em CHITAMBAR, 2016) envolvendo: (i) o transporte elétrico dependente de Ferro na cadeia respiratória (ANRAKU, 1998), (ii) a síntese de DNA envolvendo a enzima ribonucleotídeo redutase (FONTECAVE et al., 1990), (iii) a proteção contra estresse oxidativo via catalase e superóxido dismutase (HASSETT et al., 1993; FREDERICK et

al., 2001) e (iv) o transporte de Fe (III) via pioverdina (YEATS et al., 2004). Portanto, alguns poucos estudos envolvendo a exposição de modelos biológicos a Gálio já apresentaram os efeitos negativos na sobrevivência e no crescimento populacional de algumas espécies.

No organismo unicelular *Pseudomonas aeruginosa*, o crescimento populacional diminuiu em 82% após a exposição a 50 μ M de Ga (GARCÍA-CONTRERAS et al., 2013). Em organismos multicelulares, concentrações letais (LC₅₀) de Ga foram estabelecidas para peixes *Cyprinus carpio* e *Oreochromis mossambicus* em 95,6 e 36 mg/L após 96 h de exposição ao metal, respectivamente (LIN e HWANG, 1998; BETOULLE et al., 2002), e para *Oncorhynchus mykiss* foi estimada para 3,5 mg/L após 28 h de exposição (BIREG et al., 1980). Para outros animais de água doce e salobra, como *Americamysis bahia*, *Brachionus plicatilis* e *Artemia salina*, foram estabelecidas as LC₅₀ de Ga entre 10 e 50 mg/L para exposições de 96 horas (ONIKURA et al., 2005).

Em nosso estudo, nós mostramos que larvas L2 de *P. superbus* são incapazes de sobreviver em um confinamento de 7 dias em Ga, sob condições hidratadas (*i.e.*, grupo HC1). Essa incapacidade é explicada pela alta concentração de Ga, pelo ambiente hipóxico, mas também pela escassez de alimentos e, assim, resultando em uma morte natural por fome. Além disso, os vermes dessecados que foram mantidos expostos à umidade externa, na ausência de Ga (*i.e.*, grupo NC2), retomaram gradualmente às configurações hidratadas e, assim, também foram desafiados pela escassez de alimento.

Por outro lado, o grupo NC1 se manteve dessecado na condição de seca (10% UR) e isenta de Ga, e permaneceu em animação suspensa, garantindo uma alta taxa de sobrevivência, a qual é esperada desde que larvas de *Panagrolaimus* sp. são capazes de se manterem viáveis mesmo após 8 anos em dessecação extrema (AROIAN et al., 1993). Nós também mostramos que as larvas dessecadas e submersas em Ga (*i.e.*, grupo GT1) sob condições de seca (10% UR) apresentaram alta tolerância ao estresse metálico devido à anidrobiose, com taxas de sobrevivência equivalentes ao seu grupo controle, NC1.

De forma inédita, nossos resultados mostram a alta tolerância de nematoides dessecados à total imersão em blocos de Ga 99.99%, sem efeitos negativos em suas sobrevivências e dinâmicas populacionais (*i.e.*, grupos GT1 e GT2). Isso sugere a operação de estratégias intrínsecas da maquinaria de reparo da anidrobiose contra uma

condição de hipóxia e rica em metal, tais como fatores induzíveis à hipóxia (SORATHIA et al., 2019) e, possivelmente, metaloproteínas (figura 22).

Adicionalmente, a sobrevivência e o crescimento populacional do grupo GT2 não apresentou diferenças significativas em relação ao controle NC1 e ao grupo GT1. Isso significa que mesmo com os blocos de Ga expostos a 99% UR, os vermes se mantiveram dessecados e, portanto, em anidrobiose – justificando sua tolerância ao tratamento. Assim, nós sugerimos a tolerância à hipóxia mediada pela anidrobiose, uma vez que os blocos de Ga encapsularam os nematoides de maneira eficiente contra a umidade externa e, provavelmente, contra o oxigênio atmosférico, dificultando a retomada metabólica destes animais. Por fim, esse é o primeiro relato da preservação de vida no interior de uma matriz metálica.

Neste trabalho, a mensuração da concentração de oxigênio no interior dos blocos metálicos. Entretanto, como mencionado anteriormente (Seção 1.3), Ga se trata de um metal que possui baixo potencial para a ligação de átomos H e O (NAZMUTDINOV e ZINKICHEVA, 2004). Dessa forma, acreditamos que a passagem de gases da atmosfera para o interior do metal é potencialmente inviabilizada – assim como vimos para a passagem de umidade externa para o ambiente interno. Adicionalmente, considerando o interior destes blocos de Ga como um ambiente hipóxico, nossos dados de sobrevivência de *P. superbis* em anidrobiose corroboram àqueles estudos que também buscaram evidenciar a natureza ametabólica da anidrobiose (CLEGG, 1978, 1986; BARRETT, 1982; ÖRSTAN, 1998; POTTS, 1994).

Embora a toxicidade de Ga não tenha sido amplamente explorada em espécies de nematoides, suas respostas fisiológicas a metais pesados já foram observadas. Os íons metálicos dispersos no ambiente estimulam os aparatos sensoriais (*e.g.*, receptores de íons metálicos) (SAMBONGI et al., 1999) e, subsequentemente, desencadeiam respostas fisiológicas (*e.g.*, parada do bombeamento da faringe) (JONES e CANDIDO, 1999).

Visto que a anidrobiose pode aprimorar a tolerância a metais pesados, alguns nematoides parasitas de plantas, tais como *D. dipsaci* (PERRY, 1977), podem apresentar este fenômeno como estratégia de sobrevivência. Dessa forma, estes nematoides poderiam apresentar mecanismos de tolerância a metais pesados de forma similar a *P. superbis*, e dificultar ainda mais o controle de pragas na agricultura. Além disso, regiões contaminadas por metais pesados e/ou intensamente afetadas pela seca, gerada por

mudanças climáticas, podem agir como ambientes seletivos, aumentando a abundância de organismos anidrobiontes e, portanto, desequilibrando o ecossistema local.

Em outro contexto, o anfípode *Hirondellea gigas* é capaz de habitar uma das regiões mais profundas do oceano em condições de extrema pressão hidrostática (EUSTACE et al., 2013) devido ao seu exoesqueleto composto de alumínio e carbonato de cálcio (KOBAYASHI et al., 2019). Portanto, assim como esse estudo mostrou, inesperadamente, que organismos podem se utilizar de metais e incorporá-los em sua biologia, afim de obter ganhos (resistência à pressão hidrostática), outras formas naturais ou artificiais de se utilizar metais (Ga) na biologia podem surgir, tal como os blocos de Gálio para a preservação de órgãos armazenados a seco (cristalizados, i.e., em anidrobiose).

Figura 22. Tolerância mediada pela anidrobiose. Modelo para as conclusões a respeito deste estudo envolvendo a atividade de metalotioneínas em cenários de dessecação extrema. Em uma condição normal (à esquerda), os animais (imersos em tampão M9) se encontram hidratados em baixas concentrações de íons metálicos. Em dessecação extrema (à direita), os animais são expostos a altas concentrações de íons metálicos, induzindo a expressão de genes codificadores de metalotioneínas e de outros elementos da maquinaria de reparo e, portanto, promovendo a tolerância a metais e ambientes hipóxicos. Fonte: Souza, TAJ (2018).

7. Conclusões

Conclusões

Com os dados apresentados na presente dissertação, concluímos que:

- Imersão completa em confinamento hipóxico de Ga por 7 dias não induz letalidade em larvas L2 de *Panagrolaimus superbus* em anidrobiose, de forma independente da UR;
- Imersão completa em confinamento hipóxico de Ga por 7 dias não resulta em efeitos negativos no crescimento populacional de *Panagrolaimus superbus* em anidrobiose;
- Organismos não-anidrobiontes tendem a apresentar percentuais superiores de cisteínas em suas metalotioneínas;
- Organismos não-anidrobiontes apresentam maior quantidade de resíduos de cisteínas conservados entre si;
- Metalotioneínas de cianobactérias anidrobiontes e não-anidrobiontes não apresentam diferenças em suas estruturas terciárias;
- Metalotioneínas de anidrobiontes e não-anidrobiontes não apresentam diferenças em suas preferências iônicas.

8. Sugestões para trabalhos futuros

Sugestões para trabalhos futuros

Para o estudo das MTs e seus envolvimento em cenários de anidrobiose, o autor desta dissertação sugere:

- Analisar os níveis de expressão de genes codificadores de MTs, em condições de seca, via transcriptoma ou proteoma;
- Silenciar (*knockdown*) ou nocautear (*knockout*) genes codificadores de MTs e analisar seus efeitos fisiológicos em condições de seca.

Uma vez que ainda não exista um genoma completo de *P. superbis* montado e anotado em bancos de dados on-line, estas sugestões acima se tornam desafiadoras no momento. Desta forma, as sugestões devem ser aplicadas em outros organismos anidrobiontes que possuem dados genômicos disponíveis (*S. cerevisiae*, por exemplo).

9. Bibliografia

ABDURASHITOV, J.; GAVRIN, V.; GIRIN, S.; GORBACHEV, V. *et al.* The Russian-American gallium experiment (SAGE) Cr neutrino source measurement. **Physical Review Letters**, 77, n. 23, p. 4708, 1996.

ACHARD-JORIS, M.; MOREAU, J.-L.; LUCAS, M.; BAUDRIMONT, M. *et al.* Role of metallothioneins in superoxide radical generation during copper redox cycling: Defining the fundamental function of metallothioneins. **Biochimie**, 89, n. 12, p. 1474-1488, 2007.

ALCOCK, R.; COTTINGHAM, M. G.; ROLLIER, C. S.; FURZE, J. *et al.* Long-term thermostabilization of live poxviral and adenoviral vaccine vectors at supraphysiological temperatures in carbohydrate glass. **Science translational medicine**, 2, n. 19, p. 19ra12-19ra12, 2010.

ANRAKU, Y. J. A. r. o. b. Bacterial electron transport chains. **Annual review of biochemistry**, 57, n. 1, p. 101-132, 1988.

AROIAN, R. V.; CARTA, L.; KALOSHIAN, I.; STERNBERG, P. W. J. J. o. n. A free-living *Panagrolaimus* sp. from Armenia can survive in anhydrobiosis for 8.7 years. **Journal of Nematology**, 25, n. 3, p. 500, 1993.

BARRETT, J. J. P. o. t. R. S. o. L. S. B. B. S. Metabolic responses to anabiosis in the fourth stage juveniles of *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda). **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, 216, n. 1203, p. 159-177, 1982.

BETOULLE, S.; ETIENNE, J.; VERNET, G. J. B. o. e. c.; TOXICOLOGY. Acute immunotoxicity of gallium to carp (*Cyprinus carpio* L.). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 68, n. 6, p. 817-823, 2002.

BINZ, P.-A.; KÄGI, J. H. Metallothionein: molecular evolution and classification. *In: Metallothionein Iv*: Springer, 1999. p. 7-13.

BIREG, W.; BLACK, J.; WESTERMAN, A.; HUDSON, J. Aquatic toxicity tests on inorganic elements occurring in oil shale. *In: Oil Shale Symposium*. 1980.

BLINDAUER, C. A.; HARRISON, M. D.; PARKINSON, J. A.; ROBINSON, A. K. *et al.* A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98, n. 17, p. 9593-9598, 2001.

BLINDAUER, C. A.; LESZCZYSZYN, O. I. J. N. p. r. Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more. **Natural product reports**, 27, n. 5, p. 720-741, 2010.

BLINDAUER, C. A. J. J. J. o. B. I. C. Bacterial metallothioneins: past, present, and questions for the future. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 16, n. 7, p. 1011, 2011.

BLINDAUER, C. A. J. J. o. i. b. Lessons on the critical interplay between zinc binding and protein structure and dynamics. **Journal of inorganic biochemistry**, 121, p. 145-155, 2013.

BOFILL, R.; ORIHUELA, R.; ROMAGOSA, M.; DOMÈNECH, J. *et al.* *Caenorhabditis elegans* metallothionein isoform specificity–metal binding abilities and the role of histidine in CeMT1 and CeMT2. **The FEBS journal**, 276, n. 23, p. 7040-7056, 2009.

BURKE, M. J. J. M. The glass state and survival of anhydrous biological systems. **Membranes, metabolism, and dry organisms**, p. 358-363, 1986.

BUTT, T. R.; STERNBERG, E.; HERD, J.; CROOKE, S. T. J. G. Cloning and expression of a yeast copper metallothionein gene. **Gene**, 27, n. 1, p. 23-33, 1984.

CAPDEVILA, M.; ATRIAN, S. J. J. J. o. B. I. C. Metallothionein protein evolution: a miniassay. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 16, n. 7, p. 977-989, 2011.

CHITAMBAR, C. R. J. B. e. B. A.-M. C. R. Gallium and its competing roles with iron in biological systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, 1863, n. 8, p. 2044-2053, 2016.

CLAMP, M.; CUFF, J.; BARTON, G. J. E. N. JalView—analysis and manipulation of multiple sequence alignments. **EMBnet News**, 5, n. 4, p. 16-21, 1998.

CLEGG, J. J. M., metabolism; ORGANISMS, d. The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents: the 'water replacement hypothesis'. **Membranes, metabolism and dry organisms**, p. 169-187, 1986.

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

CLEGG, J. S. J. C. B.; BIOCHEMISTRY, P. P. B.; BIOLOGY, M. Cryptobiosis—a peculiar state of biological organization. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 128, n. 4, p. 613-624, 2001.

CLEGG, J. S. J. D. b. s. Hydration-dependent metabolic transitions and the state of cellular water in *Artemia* cysts. **Academic Press: New York**, p. 117-153, 1978.

COUSINS, R. J. J. P. r. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. **Physiological reviews**, 65, n. 2, p. 238-309, 1985.

COYLE, P.; HUBERT, C. A.; PHILCOX, J. C.; ROFE, A. M. J. B. t. e. r. Importance of storage conditions for the stability of zinc-and cadmium-induced metallothionein. **Biological trace element research**, 81, n. 3, p. 269-278, 2001.

CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M. J. A. r. o. p. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annual review of physiology**, 60, n. 1, p. 73-103, 1998.

CROWE, J. H.; HOEKSTRA, F. A.; CROWE, L. M. J. A. r. o. p. Anhydrobiosis. **Annual review of physiology**, 54, n. 1, p. 579-599, 1992.

CROWE, J. H. J. T. A. N. Anhydrobiosis: an unsolved problem. **The American Naturalist**, 105, n. 946, p. 563-573, 1971.

DE BOISBAUDRAN, M. L. J. A. S., Paris. Caracteres chimiques et spectroscopiques d'un nouveau metal, le gallium, decouvert dans une blende de la mine de pierrefitte, vallee d'argeles (pyrenees). **Acad. Sci., C. r.** 81, p. 493, 1875.

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

DE SOUZA, T. A. J.; PEREIRA, T. C. J. A. *Caenorhabditis elegans* Tolerates Hyperaccelerations up to 400,000 x g. **Astrobiology**, 18, n. 7, p. 825-833, 2018.

DELANO, W. L. PyMOL. 2002.

DURNAM, D. M.; PERRIN, F.; GANNON, F.; PALMITER, R. D. J. P. o. t. N. A. o. S. Isolation and characterization of the mouse metallothionein-I gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 77, n. 11, p. 6511-6515, 1980.

DZIEGIEL, P.; PULA, B.; KOBIERZYCKI, C.; STASIOLEK, M. *et al.* **Metallothioneins in normal and cancer cells**. Springer, 2016. 3319274724.

ERKUT, C.; PENKOV, S.; KHESBAK, H.; VORKEL, D. *et al.* Trehalose Renders the Dauer Larva of *Caenorhabditis elegans* Resistant to Extreme Desiccation. **Current Biology**, 21, n. 15, p. 1331-1336, Aug 2011.

EVANGELISTA, C. J. M. d. C. d. C., Departamento de Biologia, FFCLRP USP, Ribeirão Preto. Fire, A., Xu, S., Montgomery, MK, Kostas, SA, Driver, SE, Mello, CC . Potent; **NATURE**, s. g. i. b. d.-s. R. i. C. e. **Estudo da participação de uma peroxiredoxina na via de anidrobiose através de interferência por RNA (RNAi)**. 391, n. 6669, p. 806-811, 2011.

FARRANT, J. M.; MOORE, J. P. J. C. o. i. p. b. Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. **Current opinion in plant biology**, 14, n. 3, p. 340-345, 2011.

FONTECAVE, M.; GEREZ, C.; MANSUY, D.; REICHARD, P. J. J. o. B. C. Reduction of the Fe (III)-tyrosyl radical center of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase by dithiothreitol. **Journal of Biological Chemistry**, 265, n. 19, p. 10919-10924, 1990.

FORD, B. J. J. N.; LONDON, r. o. t. R. S. o. The van Leeuwenhoek specimens. **Notes and records of the Royal Society of London**, 36, n. 1, p. 37-59, 1981.

FRANÇA, M.; PANEK, A.; ELEUTHERIO, E. J. C. B.; MOLECULAR, P. P. A. *et al.* Oxidative stress and its effects during dehydration. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 146, n. 4, p. 621-631, 2007.

FREDERICK, J. R.; ELKINS, J. G.; BOLLINGER, N.; HASSETT, D. J. *et al.* Factors affecting catalase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and planktonic cells. **Appl. Environ.**

Microbiol., 67, n. 3, p. 1375-1379, 2001.

FREEDMAN, J. H.; SLICE, L. W.; DIXON, D.; FIRE, A. *et al.* The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and inducible, cell-specific expression. **Journal of Biological Chemistry**, 268, n. 4, p. 2554-2564, 1993.

FRENZEL, M.; KETRIS, M. P.; SEIFERT, T.; GUTZMER, J. J. R. P. On the current and future availability of gallium. **Resources Policy**, 47, p. 38-50, 2016.

FRONT, D.; ISRAEL, O., 1995, **The role of Ga-67 scintigraphy in evaluating the results of therapy of lymphoma patients**. Elsevier. 60-71.

GARCIA DE CASTRO, A.; TUNNACLIFFE, A. J. F. I. Intracellular trehalose improves osmotolerance but not desiccation tolerance in mammalian cells. **FEBS letters**, 487, n. 2, p. 199-202, 2000.

GARCÍA-CONTRERAS, R.; LIRA-SILVA, E.; JASSO-CHÁVEZ, R.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, I. L. *et al.* Isolation and characterization of gallium resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **International Journal of Medical Microbiology**, 303, n. 8, p. 574-582, 2013.

GIARD, A. J. C. S. B. P. L'anhydrobiose ou ralentissement des phénomènes vitaux. **CR Soc. Biol. Paris**, 46, p. 497-500, 1894.

GLANVILLE, N.; DURNAM, D. M.; PALMITER, R. D. J. N. Structure of mouse metallothionein-I gene and its mRNA. **Nature**, 292, n. 5820, p. 267, 1981.

GUIDELLI, G. V. **Análise dos efeitos do silenciamento de uma glutationala peroxidase no nematoide anidrobiótico *Panagrolaimus superbus***. 94 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

HABJANIČ, J.; ZERBE, O.; FREISINGER, E. J. M. A histidine-rich *Pseudomonas* metallothionein with a disordered tail displays higher binding capacity for cadmium than zinc. **Metallomics**, 10, n. 10, p. 1415-1429, 2018.

HASHIMSHONY, T.; FEDER, M.; LEVIN, M.; HALL, B. K. *et al.* Spatiotemporal transcriptomics reveals the evolutionary history of the endoderm germ layer. **Nature**, 519, n. 7542, p. 219, 2015.

HASSETT, D. J.; WOODRUFF, W.; WOZNIAK, D.; VASIL, M. *et al.* Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* genes encoding manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. **Journal of Bacteriology**, 175, n. 23, p. 7658-7665, 1993.

HORIKAWA, D. D.; KUNIEDA, T.; ABE, W.; WATANABE, M. *et al.* Establishment of a rearing system of the extremotolerant tardigrade *Ramazzottius varieornatus*: a new model animal

for astrobiology. **Astrobiology**, 8, n. 3, p. 549-556, 2008.

IMAGAWA, M.; ONOZAWA, T.; OKUMURA, K.; OSADA, S. *et al.* Characterization of metallothionein cDNAs induced by cadmium in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical Journal**, 268, n. 1, p. 237-240, 1990.

JEFFERSON LAB. **The element gallium**, 2p.

JIN, S.; XU, C.; LI, G.; SUN, D. *et al.* Functional characterization of a type 2 metallothionein gene, SsMT2, from alkaline-tolerant *Suaeda salsa*. **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

JONES, D.; CANDIDO, E. P. M. J. J. o. E. Z. Feeding is inhibited by sublethal concentrations of toxicants and by heat stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*: relationship to the cellular stress response. **Journal of Experimental Zoology**, 284, n. 2, p. 147-157, 1999.

JÖNSSON, K. I.; RABBOW, E.; SCHILL, R. O.; HARMS-RINGDAHL, M. *et al.* Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. **Current biology**, 18, n. 17, p. R729-R731, 2008.

JÖNSSON, K. I. J. A. Tardigrades as a potential model organism in space research. **Astrobiology**, 7, n. 5, p. 757-766, 2007.

JÖNSSON, K. I. J. I.; BIOLOGY, c. The evolution of life histories in holo-anhydrobiotic animals: a first approach. **Integrative and comparative biology**, 45, n. 5, p. 764-770, 2005.

KARIN, M.; RICHARDS, R. I. J. N. Human metallothionein genes—primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. **Nature**, 299, n. 5886, p. 797, 1982.

KEILIN, D. The Leeuwenhoek Lecture - the Problem of Anabiosis or Latent Life - History and Current Concept. **Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences**, 150, n. 939, p. 149-191, 1959.

KELSON, A. B.; CARNEVALI, M.; TRUONG-LE, V. J. C. o. i. p. Gallium-based anti-infectives: targeting microbial iron-uptake mechanisms. **Current Opinion in pharmacology**, 13, n. 5, p. 707-716, 2013.

KHAN, M.; KHAN, S.; EL-REFAIE, S.; WIN, Z. *et al.* Clinical indications for Gallium-68 positron emission tomography imaging. **European Journal of Surgical Oncology**, 35, n. 6, p. 561-567, 2009.

KIKUTA, S.; WATANABE, S. J.; SATO, R.; GUSEV, O. *et al.* Towards water-free biobanks: long-term dry-preservation at room temperature of desiccation-sensitive enzyme luciferase in air-dried insect cells. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 6540, 2017.

KLAASSEN, C. D.; LIU, J.; CHOUDHURI, S. J. A. r. o. p.; TOXICOLOGY. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. **Annual review of pharmacology and toxicology**, 39, n. 1, p. 267-294, 1999.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. J. M. b.; EVOLUTION. MEGA7: molecular

evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LANG, F. J. J. o. t. A. c. o. n. Mechanisms and significance of cell volume regulation. **Journal of the American college of nutrition**, 26, n. sup5, p. 613S-623S, 2007.

LAPINSKI, J.; TUNNACLIFFE, A. J. F. l. Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers. **FEBS letters**, 553, n. 3, p. 387-390, 2003.

LASTOWSKI-PERRY, D.; OTTO, E.; MARONI, G. J. J. o. B. C. Nucleotide sequence and expression of a *Drosophila* metallothionein. **Journal of Biological Chemistry**, 260, n. 3, p. 1527-1530, 1985.

LERCH, K. J. N. Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. **Nature**, 284, n. 5754, p. 368-370, 1980.

LI, W.; COWLEY, A.; ULUDAG, M.; GUR, T. *et al.* The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic acids research**, 43, n. W1, p. W580-W584, 2015.

LIN, H.; HWANG, P. J. B. o. e. c.; TOXICOLOGY. Acute and chronic effects of gallium chloride (GaCl₃) on tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 60, n. 6, p. 931-935, 1998.

MARGOSHES, M.; VALLEE, B. L. J. J. o. t. A. C. S. A cadmium protein from equine kidney cortex. **Journal of the American Chemical Society**, 79, n. 17, p. 4813-4814, 1957.

MATTIMORE, V.; BATTISTA, J. R. J. J. o. b. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. **Journal of Bacteriology**, 178, n. 3, p. 633-637, 1996.

MAUPAS, E. **Modes et formes de reproduction des nematodes**. 1900.

MAUPAS, E. J. A. Z. e. g. La mue et l'enkystement chez les nématodes. **Arch Zool exp gén**, 7, p. 563-628, 1899.

MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S. *et al.* Analysis tool web services from the EMBL-EBI. **Nucleic acids research**, 41, n. W1, p. W597-W600, 2013.

MEKAWY, A. M. M.; ASSAHA, D. V.; MUNEHIRO, R.; KOHNISHI, E. *et al.* Characterization of type 3 metallothionein-like gene (OsMT-3a) from rice, revealed its ability to confer tolerance to salinity and heavy metal stresses. **Environmental and experimental botany**, 147, p. 157-166, 2018.

MOILANEN, L. H.; FUKUSHIGE, T.; FREEDMAN, J. H. J. J. o. B. C. Regulation of metallothionein gene transcription identification of upstream regulatory elements and transcription factors responsible for cell-specific expression of the metallothionein genes from *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biological Chemistry**, 274, n. 42, p. 29655-29665, 1999.

MOSELEY, B.; EVANS, D. M. J. M. Isolation and properties of strains of *Micrococcus (Deinococcus) radiodurans* unable to excise ultraviolet light-induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways. **Microbiology**, 129, n. 8, p. 2437-2445, 1983.

MOSKALYK, R. J. M. E. Gallium: the backbone of the electronics industry. **Minerals Engineering**, 16, n. 10, p. 921-929, 2003.

MÜLLER, H.; ACHILLES-DAY, U. E.; DAY, J. G. J. E. j. o. p. Tolerance of the resting cysts of *Colpoda inflata* (Ciliophora, Colpodea) and *Meseres corlissi* (Ciliophora, Spirotrichea) to desiccation and freezing. **European journal of protistology**, 46, n. 2, p. 133-142, 2010.

MÜNGER, K.; GERMANN, U. A.; LERCH, K. J. T. E. j. Isolation and structural organization of the *Neurospora crassa* copper metallothionein gene. **The EMBO journal**, 4, n. 10, p. 2665-2668, 1985.

NAZMUTDINOV, R.; ZINKICHEVA, T. J. R. J. o. E. Dissociative adsorption of water molecules on uncharged surfaces of indium (111) and gallium. **Russian Journal of Electrochemistry**, 40, n. 4, p. 379-386, 2004.

NISHIUCHI, S.; LIU, S.; TAKANO, T. J. B. I. Isolation and characterization of a metallothionein-1 protein in *Chloris virgata* Swartz that enhances stress tolerances to oxidative, salinity and carbonate stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology letters**, 29, n. 8, p. 1301-1305, 2007.

OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. J. P. E. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, 151, n. 1, p. 85-100, 2000.

ONIKURA, N.; NAKAMURA, A.; KISHI, K. J. B. o. e. c.; TOXICOLOGY. Acute toxicity of gallium and effects of salinity on gallium toxicity to brackish and marine organisms. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 75, n. 2, p. 356-360, 2005.

OOMS, J. J.; LEON-KLOOSTERZIEL, K. M.; BARTELS, D.; KOORNNEEF, M. *et al.* Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants). **Plant physiology**, 102, n. 4, p. 1185-1191, 1993.

ÖRSTAN, A. Factors affecting long-term survival of dry bdelloid rotifers: a preliminary study. In: **Rotifera VIII: A Comparative Approach**: Springer, 1998. p. 327-331.

PAGANI, A.; VILLARREAL, L.; CAPDEVILA, M.; ATRIAN, S. J. M. m. The *Saccharomyces cerevisiae* Crs5 metallothionein metal-binding abilities and its role in the response to zinc overload. **Molecular microbiology**, 63, n. 1, p. 256-269, 2007.

PALACIOS, Ò.; ATRIAN, S.; CAPDEVILA, M. J. J. J. o. B. I. C. Zn-and Cu-thioneins: a functional classification for metallothioneins? **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 16, n. 7, p. 991, 2011.

PERRY, R. J. P. Desiccation survival of larval and adult stages of the plant parasitic nematodes,

Ditylenchus dipsaci and *D. myceliophagus*. **Parasitology**, 74, n. 2, p. 139-148, 1977.

PETERSON, C. W.; NARULA, S. S.; ARMITAGE, I. M. J. F. I. 3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins. **FEBS letters**, 379, n. 1, p. 85-93, 1996.

PETERSON, M. G.; LAZDINS, I.; DANKS, D. M.; MERCER, J. F. J. E. j. o. b. Cloning and sequencing of a sheep metallothionein cDNA. **European journal of biochemistry**, 143, n. 3, p. 507-511, 1984.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. J. N. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, 164, n. 4172, p. 666, 1949.

POTTS, M. J. M. M. B. R. Desiccation tolerance of prokaryotes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 58, n. 4, p. 755-805, 1994.

RAHM, P. G. J. Z. f. a. P. Biologische und physiologische Beitrage zur Kenntnis de Moosfauna. **Zeitschrift fur allgemeine Physiologie**, 20, p. 1-35, 1923.

REARDON, W.; CHAKRABORTEY, S.; PEREIRA, T. C.; TYSON, T. *et al.* Expression profiling and cross-species RNA interference (RNAi) of desiccation-induced transcripts in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. **BMC molecular biology**, 11, n. 1, p. 6, 2010.

REBECCHI, L.; ALTIERO, T.; GUIDETTI, R.; CESARI, M. *et al.* Tardigrade resistance to space effects: first results of experiments on the LIFE-TARSE mission on FOTON-M3 (September 2007). **Astrobiology**, 9, n. 6, p. 581-591, 2009.

RICHARDS, R. I.; HEGUY, A.; KARIN, M. J. C. Structural and functional analysis of the human metallothionein-IA gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. **Cell**, 37, n. 1, p. 263-272, 1984.

SAKURAI, M.; FURUKI, T.; AKAO, K.-i.; TANAKA, D. *et al.* Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105, n. 13, p. 5093-5098, 2008.

SAMBONGI, Y.; NAGAE, T.; LIU, Y.; YOSHIMIZU, T. *et al.* Sensing of cadmium and copper ions by externally exposed ADL, ASE, and ASH neurons elicits avoidance response in *Caenorhabditis elegans*. **Neuroreport**, 10, n. 4, p. 753-757, 1999.

SARAGUSTY, J.; LOI, P. J. T. Exploring dry storage as an alternative biobanking strategy inspired by Nature. **Theriogenology**, 126, p. 17-27, 2018.

SCHEBOR, C.; GALVAGNO, M.; DEL PILAR BUERA, M.; CHIRIFE, J. J. B. p. Glass transition temperatures and fermentative activity of heat-treated commercial active dry yeasts. **Biotechnology progress**, 16, n. 2, p. 163-168, 2000.

SCHMIDT, C. J.; HAMER, D. H. J. G. Cloning and sequence analysis of two monkey metallothionein cDNAs. **Gene**, 24, n. 1, p. 137-146, 1983.

SEARLE, P.; DAVISON, B.; STUART, G.; WILKIE, T. *et al.* Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes. **Molecular and Cellular Biology**, 4, n. 7, p. 1221-1230, 1984.

SHANNON, A. J.; BROWNE, J. A.; BOYD, J.; FITZPATRICK, D. A. *et al.* The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics of species and strains of *Panagrolaimus* (Nematoda, Panagrolaimidae). **Journal of Experimental Biology**, 208, n. 12, p. 2433-2445, 2005.

SHATILOVICH, A.; TCHESUNOV, A.; NERETINA, T.; GRABARNIK, I. *et al.*, 2018, **Viable nematodes from late Pleistocene permafrost of the Kolyma river lowland**. Springer. 100-102.

SHEN-MILLER, J.; MUDGETT, M. B.; SCHOPF, J. W.; CLARKE, S. *et al.* Exceptional seed longevity and robust growth: ancient sacred lotus from China. **American Journal of Botany**, 82, n. 11, p. 1367-1380, 1995.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, 7, n. 1, 2011.

SMITHELLS, C.; RANSLEY, C. J. P. o. t. R. S. o. L. S. A.-M.; SCIENCES, P. The diffusion of gases through metals. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences**, 150, n. 869, p. 172-197, 1935.

SORATHIA, N.; CHAWDA, N.; SARAOKI, K.; RAJADHYAKSHA, M. S. *et al.* hif-1 plays a role in hypoxia-induced gustatory plasticity of *Caenorhabditis elegans*. **International Journal of Neuroscience**, 129, n. 9, p. 864-870, 2019.

SPRUYT, M.; BUQUICCHIO, F. J. W. h. w. g. n. Gene runner version 3.05. 1994.

STEINER, G.; ALBIN, F. E. J. J. o. t. w. a. o. s. Resuscitation of the nematode *Tylenchus polyhypnus* sp., after almost 39 years' dormancy. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, 36, n. 3, p. 97-99, 1946.

STRAIN, J.; CULOTTA, V. C. J. M.; MGG, G. G. Copper ions and the regulation of *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein genes under aerobic and anaerobic conditions. **Molecular and General Genetics**, 251, n. 2, p. 139-145, 1996.

STÜRZENBAUM, S. R.; WINTERS, C.; GALAY, M.; MORGAN, A. J. *et al.* Metal ion trafficking in earthworms Identification of a cadmium-specific metallothionein. **Journal of Biological Chemistry**, 276, n. 36, p. 34013-34018, 2001.

STRYER, L. **Biochemistry**. New York: Freeman, 1999.

SUN, W. Q.; LEOPOLD, A. C. J. C. B.; PHYSIOLOGY, P. P. A. Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 117, n. 3, p. 327-333, 1997.

SZKLARSKA-SMIALOWSKA, Z.; XIA, Z. J. C. S. Hydrogen trapping by cold-worked X-52

steel. **Corrosion Science**, 39, n. 12, p. 2171-2180, 1997.

The C-elegans sequencing consortium. **Science**, 283, n. 5410, p. 2103-2103, Mar 1999.

TYSON, T.; ZAMORA, G. O. M.; WONG, S.; SKELTON, M. *et al.* A molecular analysis of desiccation tolerance mechanisms in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus* using expressed sequenced tags. **BMC research notes**, 5, n. 1, p. 68, 2012.

VAN LEEUWENHOEK, A. J. P. T. A Letter to the Royal Society, from Mr Anthony Van Leeuwenhock, FRS concerning Animalcula on the Roots of Duck-Weed, etc. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, 24, p. 1784-1793, 1704.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CERATTO, N.; PANFOLI, I. J. C. *et al.* Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, 46, n. 2, p. 407-417, 2000.

VREELAND, R. H.; ROSENZWEIG, W. D.; POWERS, D. W. J. N. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. **Nature**, 407, n. 6806, p. 897, 2000.

WILSON, C. G.; SHERMAN, P. W. J. S. Anciently asexual bdelloid rotifers escape lethal fungal parasites by drying up and blowing away. **Science**, 327, n. 5965, p. 574-576, 2010.

WOMERSLEY, C.; SMITH, L. J. C. B.; BIOCHEMISTRY, P. P. B. C. Anhydrobiosis in nematodes—I. The role of glycerol myo-inositol and trehalose during desiccation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, 70, n. 3, p. 579-586, 1981.

YANG, J.; WANG, Y.; LIU, G.; YANG, C. *et al.* *Tamarix hispida* metallothionein-like ThMT3, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, and NaCl in transgenic yeast. **Molecular biology reports**, 38, n. 3, p. 1567-1574, 2011.

YEATS, C.; RAWLINGS, N. D.; BATEMAN, A. J. T. i. b. s. The PepSY domain: a regulator of peptidase activity in the microbial environment? **Trends in biochemical sciences**, 29, n. 4, p. 169-172, 2004.

YOSHIDA, Y.; KOUTSOVOULOS, G.; LAETSCH, D. R.; STEVENS, L. *et al.* Comparative genomics of the tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varieornatus*. **PLoS biology**, 15, n. 7, p. e2002266, 2017.

ZALUPS, R. K.; KOROPATNICK, J. J. J. o. P.; THERAPEUTICS, E. Temporal changes in metallothionein gene transcription in rat kidney and liver: relationship to content of mercury and metallothionein protein. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 295, n. 1, p. 74-82, 2000.

ZHANG, Y. J. B. b. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC bioinformatics**, 9, n. 1, p. 40, 2008.

10. Anexos

ANEXO A. Estruturas de MTs disponíveis no PDB**A.1** PDB ID: 6GRV

Cadmium(II) form of full-length metallothionein from Pseudomonas fluorescens Q2-87 (PflQ2MT)

Autores: Habjanic, K., Zerbe, O., Freisinger, E.

A.2 PDB ID: 1JJD

NMR structure of the Cyanobacterial Metallothionein SmtA

Autores: Sadler, P.J., Robinson, N.J.

ANEXO B. Níveis de expressão de *mtl-1* em diferentes estágios de desenvolvimento de *C. elegans*.

Legenda: FPKM – fragmentos por kilobase do transcrito por milhão de *reads* mapeados (eixo Y). EE – embrionário inicial; LE – embrionário tardio; L1 a L4 – estágios larvais; YA – jovem adulto; Male EM – macho experimental. Fonte: WormBase.

11. Apêndices

APÊNDICE A. Micrografia do resultado exemplar de análise de viabilidade de nematoides via coloração por Eritrosina B. Larva corada (em vermelho, na região superior) é considerada como morta, enquanto a não-corada como vivas (região inferior).

APÊNDICE B. Alinhamento entre estruturas terciárias (1AQQ e 1AQR) de uma mesma MT de *S. cerevisiae*, contendo diferentes átomos coordenados (*i.e.*, cobre e prata), resultando em RMSD = 2.487.