

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

Yasmin de Araújo Ribeiro

Análises *in silico* de DAF-2 e exposição de *Panagrolaimus superbus*
em câmara anóxica de Nitrogênio (N₂)

Ribeirão Preto, SP

2021

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

Yasmin de Araújo Ribeiro

Análises in silico de DAF-2 e exposição de Panagrolaimus superbus
em câmara anóxica de Nitrogênio (N₂)

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

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira.

Ribeirão Preto, SP

2021

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

Ribeiro, Yasmin de Araújo.

Análises *in silico* de DAF-2 e exposição de *Panagrolaimus superbus* em câmara anóxica de Nitrogênio (N₂).

Yasmin de Araújo Ribeiro. Ribeirão Preto: USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2021.

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. Ametabolismo. 3. Anóxia. 4. *daf-2*.

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
 - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
 - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
 - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
-

A todas as mulheres que lutaram pelo meu direito de exercer ciência.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Tiago Campos Pereira pela valiosa orientação, admissão em seu laboratório, e confiança em mim depositada ao longo dessa trajetória. Obrigada por todo entusiasmo, paciência, incentivo e acolhimento, e por ter sido humano e gentil nos momentos desafiadores. Serei sempre grata, e o tomarei sempre como um exemplo a ser seguido.

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.

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 antes mesmo do meu ingresso ao mestrado.

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.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela infraestrutura e espaço físico que possibilitou os ensaios em câmara anóxica. Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Douglas Galante pela colaboração e solicitude.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular da Anidrobiose Danyel Contiliani e Vitor Nolasco por me ensinarem tanto, e tornarem minha rotina no laboratório a mais amável possível. Vocês são incríveis!

Aos colegas da Casa 109 pelas ricas conversas; aos amigos do Apto 904 pelos momentos de leveza, e aos amigos que a Universidade de São Paulo me presenteou e que não seria capaz de nomear individualmente. Obrigada por iluminarem meu caminho, tornarem esta etapa tão memorável, e pelo imenso privilégio de ter vocês em minha vida!

A minha família pelo apoio irrestrito, por aceitarem e apoiarem minhas escolhas mesmo quando não as compreendia; e ao meu par dessa vida (e desconfio que de outras também) Guilherme A., por todo afeto e companheirismo ao longo dos anos. Sou grata e feliz por ter vocês ao meu lado!

- *[...] The Answer to the Great Question... Of Life, the Universe and Everything... Is... Forty-two! - said Deep Thought, with infinite majesty and calm.*

Douglas Adams, The Hitchhiker's Guide to the Galaxy. (Adapted).

RESUMO**Análises *in silico* de DAF-2 e exposição de *Panagrolaimus superbus* em câmara anóxica de Nitrogênio (N₂)**

A anidrobiose, termo derivado do grego “vida sem água”, é um curioso estado de animação suspensa no qual determinados organismos adentram em resposta a dessecação extrema. Atualmente, organismos representantes de todos os reinos já foram identificados com essa capacidade, incluindo o nematoide utilizado neste estudo, *Panagrolaimus superbus*. O estado anidrobiótico permite a tolerância a uma grande diversidade de estresses físicos como extremos de temperatura, hiperaceleração e imersão em gálio. Devido as interessantes propriedades que a anidrobiose confere aos organismos, a melhor compreensão desse fenômeno tem despertado o interesse da comunidade científica. Nesse sentido, uma questão central é a caracterização do estado ametabólico, ainda pouco aceito pela comunidade científica. Paralelamente, o gene *daf-2* codifica uma proteína que direciona o desenvolvimento do nematoide *Caenorhabditis elegans*, sendo sua atuação essencial para a anidrobiose. Considerando o contexto, o presente estudo objetiva contribuir para melhor definição do metabolismo de organismos anidrobiontes e investigar a proteína codificada por *daf-2* em busca de possíveis assinaturas moleculares da anidrobiose. Dessa forma, o organismo anidrobionte *P. superbus* foi mantido por um, três, e seis meses em câmara anóxica e analisamos *in silico* (e.g., composição, modelagem estrutural, análise e alinhamento de estruturas primárias e terciárias) a proteína DAF-2 em organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes. Os resultados encontrados sugerem que a proteína de organismos anidrobiontes é significativamente mais básica, embora não apresente divergências em suas estruturas terciárias. Demonstramos também que a exposição de *P. superbus* dessecados em câmara anóxica de N₂ por um, três, e seis meses, não impacta negativamente em sua viabilidade, quando comparada com seus respectivos grupos controles. Portanto, nós somamos novas evidências a hipótese de ametabolismo durante a anidrobiose e pontuamos a característica de basicidade como algo de importância para este interessante estado.

Palavras-chave: Anidrobiose; ametabolismo; anóxia; *P. superbus*.

ABSTRACT***In silico* analysis of DAF-2 and exposure of *Panagrolaimus superbus* in anoxic Nitrogen (N₂) chamber**

Anhydrobiosis, a term derived from the Greek “life without water”, is a curious state of suspended animation into which certain organisms enter in response to extreme desiccation. Currently, organisms representing all kingdoms have already been identified with this ability, including the nematode used in this study, *Panagrolaimus superbus*. The anhydrobiotic state allows tolerance to a wide variety of physical stresses such as temperature extremes, hyperacceleration, and immersion in gallium. Due to the interesting properties that anhydrobiosis gives to organisms, a better understanding of this phenomenon has aroused the interest of the scientific community. In this sense, a central issue is the characterization of the ametabolic state, still little accepted by the scientific community. In parallel, the *daf-2* gene encodes a protein that directs the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*, its role being essential for anhydrobiosis. Considering the context, this study aims to contribute to a better definition of the metabolism of anhydrobiotic organisms and to investigate the protein encoded by *daf-2* in search of possible anhydrobiosis-related molecular signatures. Thus, the anhydrobiont organism *P. superbus* was kept for one, three, and six months in an anoxic chamber, and we *in silico* analyzed (*e.g.*, composition, structural modeling, analysis, and alignment of primary and tertiary structures) the DAF-2 protein in anhydrobiont organisms and non-anhydrobionts. The results found suggest that the protein of anhydrobiont organisms is significantly more basic, although it does not present divergences in its tertiary structures. We also demonstrated that the exposure of *P. superbus* desiccated in an anoxic N₂ chamber for one, three, and six months, does not negatively impact its viability, when compared to their respective control group. Therefore, we add new evidence to the hypothesis of ametabolism during anhydrobiosis and we point out the basicity characteristic as something of importance for this interesting state.

Keywords: Anhydrobiosis; ametabolism; anoxia; *P. superbus*.

Lista de siglas, símbolos, acrônimos e abreviaturas

*	Diferença estatisticamente significativa
~	Aproximadamente
°C	Grau Celsius (unidade de temperatura)
Å	Ångström
BLAST	(<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>): Ferramenta de pesquisa por alinhamento local
C1	Controle negativo 1 mês
C3	Controle negativo 3 meses
C6	Controle negativo 6 meses
CO ₂	Dióxido de carbono
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
<i>e.g.</i>	(<i>Exempli gratia</i>) locução latina que significa “por exemplo”
EA	Engenharia anidrobiótica
<i>et al.</i>	(<i>et alia</i>) e outros colaboradores
g	Grama (unidade de massa)
g/g	Proporção massa por massa
H	Hidrogênio
h	Hora (unidade de tempo)
H ₂ O	Água
Hg	Mercúrio

<i>i.e.</i>	(<i>id est</i>) isto é
L3	Larvas no 3º estágio de desenvolvimento
L4	Larvas no 4º estágio de desenvolvimento
LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant</i>
m/v	Proporção massa por volume
M9	Solução tampão isosmótica para nematoide
mg/L	Miligramas por litro (proporção massa por volume)
mL	Mililitro
N1	Amostra exposta em câmara de N ₂ por um mês
N ₂	Gás nitrogênio
N3	Amostra exposta em câmara de N ₂ por três meses
N6	Amostra exposta em câmara de N ₂ por seis meses
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>	<i>P</i> -valor
RMSD	(<i>Root mean square deviation</i>): Raiz quadrada do desvio padrão entre átomos sobrepostos (em ångström)

UR	Umidade relativa
δ	Sigma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
$\mu\text{mol/l}$	Micromol por litro
π	Pi

Lista de figuras

Figura 1. Representantes anidrobiontes dos cinco reinos biológicos	3
Figura 2. O nematoide <i>P. superbus</i> em meio de cultivo	4
Figura 3. Processo de dessecação e manutenção de macromoléculas.....	4
Figura 4. Condições de ativação e inativação do receptor DAF-2.....	8
Figura 5. Via <i>daf-2</i> ativa.....	9
Figura 6. Via <i>daf-2</i> inativa	10
Figura 7. Característica físico-química de DAF-2	23
Figura 8. Razão entre aminoácidos conservados.....	24
Figura 9. Alinhamento e conservação de sequências primárias de anidrobiontes	25
Figura 10. Alinhamento e conservação de sequências primárias de não-anidrobiontes	26
Figura 11. Alinhamento e conservação de sequências primárias geral.....	27
Figura 12. Estruturas do domínio quinase de animais anidrobiontes e não-anidrobiontes geradas <i>ab initio</i>	29
Figura 13. Estruturas do domínio quinase de <i>W. mirabilis</i> e <i>S. lepidophylla</i> geradas <i>ab initio</i>	30
Figura 14. Alinhamento de estruturas terciárias do domínio quinase de DAF-2 de organismos anidrobiontes	32
Figura 15. Alinhamento de estruturas terciárias do domínio quinase de DAF-2 de organismos não-anidrobiontes	32
Figura 16. Alinhamento geral de estruturas terciárias do domínio quinase de DAF-2.....	33
Figura 17. Alinhamento de estruturas editadas e originais do domínio quinase de <i>W. mirabilis</i> e <i>S. lepidophylla</i>	34
Figura 18. Viabilidade de <i>P. superbus</i>	36

Lista de tabelas

Tabela 1. Sequências de organismos não-anidrobiontes	19
Tabela 2. Sequências de organismos anidrobiontes	19
Tabela 3 Substituições de aminoácidos	20
Tabela 4. Resultados dos parâmetros de qualidade.	31
Tabela 5. Alinhamento de estruturas tridimensionais de organismos anidrobiontes.....	35
Tabela 6. Alinhamento de estruturas tridimensionais de organismos não-anidrobiontes.	35
Tabela 7. Alinhamento geral de estruturas tridimensionais.....	35
Tabela 8. Alinhamento de estruturas tridimensionais editas e originais de plantas anidrobiontes	35

Sumário

Lista de siglas, símbolos, acrônimos e abreviaturas	10
Lista de figuras	13
Lista de tabelas	14
1. Introdução	1
1.1 Anidrobiose.....	2
1.1.1 Conceitos gerais e mecanismo molecular	2
1.1.2 Ametabolismo	6
1.1.3 Engenharia anidrobiótica	7
1.2 O gene <i>daf-2</i>	8
1.3 Câmara de N ₂	10
2. Hipótese	12
2.1 Hipótese do trabalho	13
3. Objetivos.....	14
3.1 Objetivos	15
3.1.1 Objetivos gerais.....	15
3.1.2 Objetivos específicos	15
4. Materiais e Métodos	16
4.1 Manutenção de nematoides.....	17
4.2 Obtenção de <i>P. superbus</i>	17
4.3 Ensaio de dessecação	17
4.4 Exposição em câmara anóxica	17
4.5 Ensaio de viabilidade	18
4.6 Análise estatística	18
4.7 Análises <i>in silico</i>	19
4.7.1 Obtenção de sequências de DAF-2	19
4.7.2 Análise de composição de DAF-2.....	20
4.7.3 Alinhamento múltiplo de sequências	20
4.7.4 Análise de razão	20
4.7.5 Substituição de aminoácidos	20
4.7.6 Modelagem <i>ab initio</i>	21
4.7.7 Parâmetros de qualidade	21
4.7.8 Sobreposição de modelagens	21
5. Resultados	22

5.1 Análises <i>in silico</i>	23
5.1.1 Análise de composição de DAF-2.....	23
5.1.2 Análise de razão	24
5.1.3 Alinhamentos múltiplos de sequências	24
5.1.4 Modelagem <i>ab initio</i>	28
5.1.5 Parâmetros de qualidade	31
5.1.6 Sobreposição de modelagens	31
5.2 Exposição em câmara anóxica	36
5.2.1 Ensaio de viabilidade	36
6. Discussão	37
6.1 Análises <i>in silico</i>	38
6.2 Exposição em câmara anóxica	41
7. Conclusões	45
8. Sugestões.....	47
9. Bibliografia.....	49
10. Anexos.....	56
11. Apêndices.....	58

1. Introdução

1.1 Anidrobiose

1.1.1 Conceitos gerais e mecanismo molecular

A água é considerada essencial para a existência de vida. Na natureza, todos os organismos são dependentes desta, e em sua ausência sofrem com efeitos negativos. Curiosamente, determinados organismos são capazes de superar este o obstáculo e permanecer viáveis durante dessecação, questionando o conceito de vida e intrigando a biologia molecular.

Em 1702, o microbiologista holandês Antony van Leeuwenhoek observava em seu microscópio uma amostra de calha seca oriunda do telhado, aparentemente sem vida. Entretanto, ao adicionar algumas gotas de água nessa amostra, foi surpreendido por pequenos organismos capazes de voltar à atividade quando hidratados, os quais foram denominados de “animálculos” (Clegg, 2001; Tunnacliffe & Lapinski, 2003). Estima-se que esta tenha sido a primeira descrição do que hoje chamamos de anidrobiontes, sendo o organismo descrito consideravelmente semelhante ao rotífero bdeloide *Philodina roséola* (Tunnacliffe & Lapinski, 2003).

O termo anidrobiose, derivado do grego “vida sem água”, foi proposto por Alfred Giard quase dois séculos depois, em 1894, para referir-se a um estado de animação suspensa, altamente estável no qual determinados organismos adentram em resposta a cenários de dessecação extrema.

Posteriormente, em 1959, David Keilin categorizou a anidrobiose como uma forma particular de criptobiose. A criptobiose é uma adaptação contra estresses ambientais, em que para cada fator que o induz, temos uma terminologia diferente: anidrobiose, dessecação extrema; criobiose, congelamento; anoxibiose, ausência de oxigênio; osmobiose, osmolaridade elevada; e termobiose, por altas ou baixas temperaturas (Keilin, 1959; Watanabe, 2006).

Além da resistência a dessecação, durante o estado anidrobiótico, os organismos apresentam tolerância a diversos tipos de estresse, como radiação ionizante, vácuo, temperaturas extremas, altas pressões hidrostáticas, dentre outros (Tunnacliffe e Lapinski, 2003; Hengherr *et al.*, 2009; Horikawa *et al.*, 2009; Jönsson *et al.*, 2008; Beltrán-Pardo *et al.*, 2013), o que é de grande interesse biotecnológico.

Assim, com o avanço e interesse da comunidade científica em melhor compreender o fenômeno da anidrobiose, já foram descritos organismos representantes em todos os reinos taxonômicos: Monera – a bactéria *Deinococcus radiodurans* (figura 1A) (Mattimore e Battista, 1996); Fungi – a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (figura 1B) (Shamrock e Lindsey *et al.*, 2008); Protista – o ciliado *Colpoda inflata* (figura 1C) (Müller *et al.*, 2010); Animalia – o tardígrado *Milnesium tardigradum* (figura 1D) (Horikawa *et al.*, 2006); Plantae – a traqueófito *Selaginella lepidophylla* (figura 1E) (Oliver *et al.*, 2000).

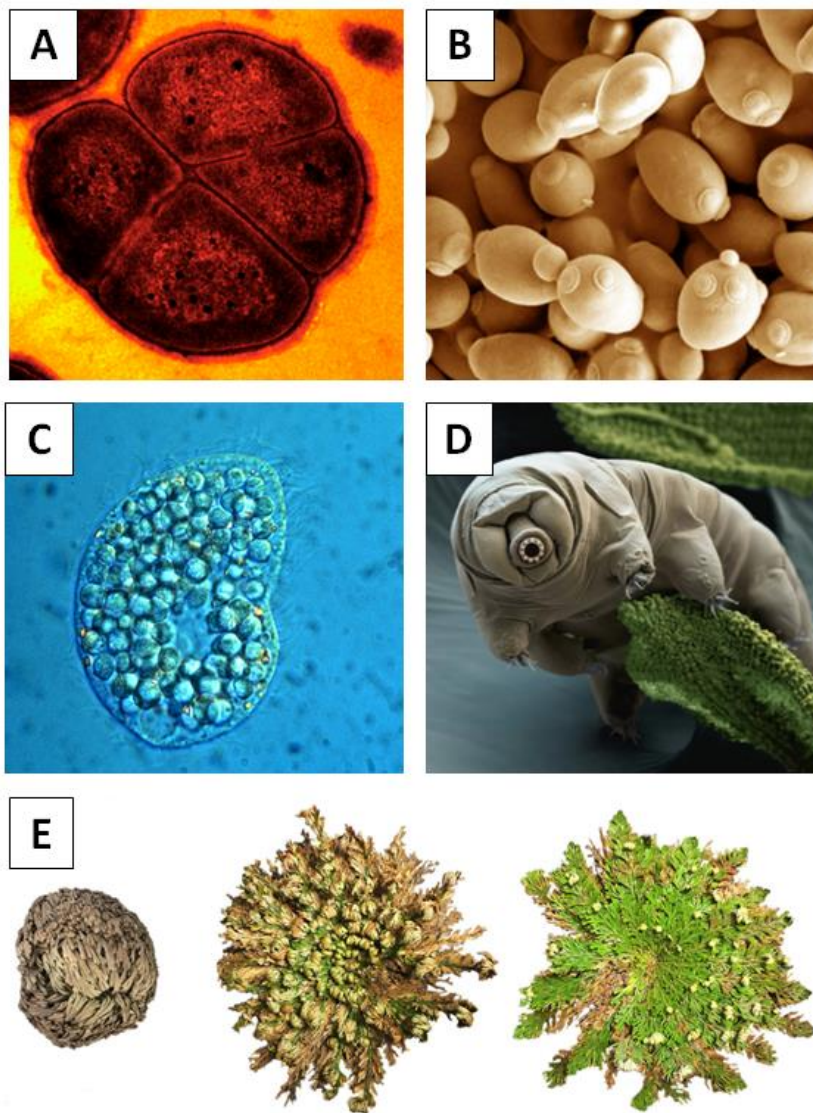


Figura 1. Representantes anidrobiontes dos cinco reinos biológicos. (A) Reino Monera, *Deinococcus radiodurans*; (B) Reino Fungi, *Saccharomyces cerevisiae*; (C) Reino Protista, *Colpoda inflata*; (D) Reino Animalia, *Milnesium tardigradum*; (E) Reino Plantae, *Selaginella lepidophylla*.

Os anidrobiontes podem ser classificados de acordo com a fase de desenvolvimento em que conseguem sobreviver a dessecação extrema. Aqueles que adentram em animação suspensa apenas em um determinado estágio de desenvolvimento são denominados anidrobiontes estágio-específicos. O nematoide *Caenorhabditis elegans*, manifesta o estado anidrobiótico apenas durante o estágio larval *dauer*, e por isso é classificado como estágio-específico (Erkut *et al.*, 2011; Tyson *et al.*, 2012). Já os organismos capazes de sobreviver a dessecação extrema em qualquer fase do ciclo de vida são chamados de holo-anidrobiontes (Jönsson, 2005). Neste trabalho, utilizamos uma espécie de nematoide holo-anidrobionte, o organismo modelo *Panagrolaimus superbis* (figura 2) (Shannon *et al.*, 2005).



Figura 2. O nematoide *P. superbis* em meio de cultivo. Espécie holo-anidrobionte, bacterióvoro.

Para que um organismo adentre em animação suspensa, adaptações moleculares são necessárias. Assim, o processo de entrada em anidrobiose apresenta três estágios: desidratação, dessecação e seco (ou anidrobionte propriamente dito) (figura 3).

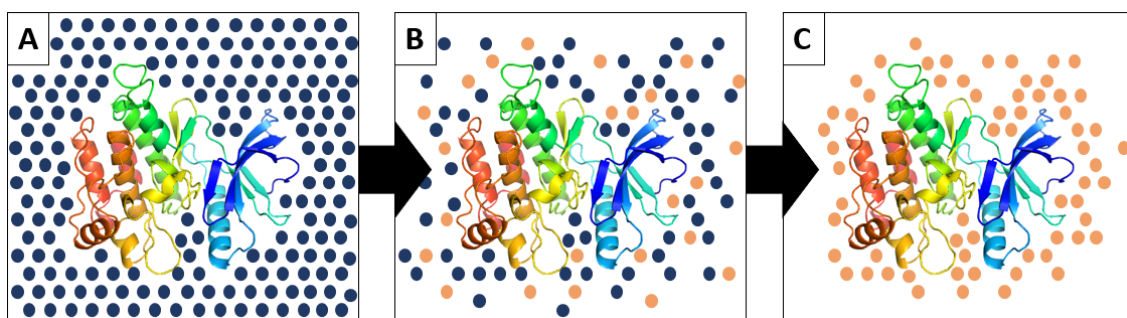


Figura 3. Processo de dessecação e manutenção de macromoléculas. (A) Estrutura proteica totalmente

hidratada e conservada; (B) Síntese de dissacarídeos (pontos laranja) em resposta à desidratação; (C) Formação do biovidro.

Durante o primeiro estágio, a desidratação, ocorre a perda progressiva de água. No entanto, macromoléculas e fosfolípidios permanecem hidratados, resultando em alterações na concentração intracelular dos solutos, no pH e na viscosidade da célula. Essas alterações, por sua vez, podem interferir na estabilidade de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos de membrana, devido a alterações entre ligações de hidrogênio, forças hidrofóbicas e de *Van der Waals* (Stryer, 1999 *apud* Tunnacliffe & Lapinski, 2003). Nesta etapa, o metabolismo celular se torna restrito, e há falhas nas vias bioquímicas (Clegg, 1978; Womersley & Smith, 1981). A célula responde ao estresse hídrico por meio do acúmulo de proteínas hidrofílicas e dissacarídeos não-redutores, como a sacarose e a trealose (Tunnacliffe & Lapinski, 2003).

Chamada dessecação, o estágio seguinte é estabelecido quando a quantidade de água na célula atinge valores inferiores a 0,3 g/g de massa seca, e ao atingir 0,1 g/g de massa seca, o metabolismo é interrompido (Tunnacliffe & Lapinski, 2003). A fim de impedir a instabilidade e danos estruturais irreversíveis à membrana fosfolipídica, ácidos nucleicos e proteínas, pela desidratação de macromoléculas, os dissacarídeos não-redutores acumulados no estágio anterior (*i.e.*, sacarose e a trealose) atuam como moléculas de água, por meio da formação de ligações de hidrogênio (Clegg, 1974, Crowe e Madin, 1974; Clegg *et al.*, 1982; Crowe *et al.*, 1992).

Por fim, durante o estágio seco, temos a anidrobiose propriamente dita. A anidrobiose tem o potencial de manter a estabilidade e viabilidade do organismo durante longos períodos. Este estágio é o resultado de um fenômeno denominado “vitrificação”, em que o citoplasma é substituído por uma matriz sólida amorfa, denominada biovidro (*bioglass*) (Sakurai *et al.*, 2008). A vitrificação é promovida por meio dos dissacarídeos não-redutores que atuam como estabilizadores cinéticos impedindo a difusão molecular, estacionando as reações químicas e aumentando a viscosidade do meio devido às suas altas concentrações intracelulares. Finalmente, resultando no estado de animação suspensa (Sun e Leopold, 1997; Crowe *et al.*, 1998; Tunnacliffe e Lapinski, 2003).

Embora a presença de solutos compatíveis seja importante para o estado anidrobiótico (Keilin, 1959; Crowe, 1971; Womersley e Smith, 1981; Crowe *et al.*, 1992, 1998; Sun e Leopold, 1998; Clegg, 2001, Sakurai *et al.*, 2008) sozinhos, são insuficientes para permitir entrada em anidrobiose.

Pesquisas anteriores demonstraram que em cenários onde a síntese de dissacarídeos não-redutores foi intensificada em organismos não-anidrobiontes, como ratos e plantas, mesmo com o acúmulo considerável destas moléculas, as células foram incapazes de adentrar em anidrobiose (Garcia de Castro e Tunnacliffe, 2000; Ooms *et al.*, 1993). Paralelamente, pesquisadores evidenciaram também que determinados rotíferos anidrobiontes não acumulam dissacarídeos não-redutores (Lapinski e Tunnacliffe, 2003).

Neste sentido, evidencia-se a complexidade dos elementos operatórios da animação suspensa. Sua complexidade extrapola o acúmulo de solutos compatíveis e inclui outros fatores, como sistema de reparo de ácidos nucleicos, sistema antioxidante, proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*), e a regulação de genes específicos (revisto em Lapinski e Tunnacliffe, 2003; Reardon *et al.*, 2010; Tyson *et al.*, 2012). É notável que não há um processo único e comum entre as espécies anidrobiontes, sendo este um fenômeno complexo e que permanece pouco elucidado.

1.1.2 Ametabolismo

Além dos mecanismos que promovem a anidrobiose, outra questão que permanece em aberto é a caracterização metabólica desse fenômeno. Alguns poucos estudos investigaram, por diferentes metodologias, a presença ou ausência de metabolismo (*i.e.*, demanda de oxigênio nas células) em cenário anidrobiótico.

Recentemente, nosso grupo mostrou que o nematoide *P. superbus* sobrevive em imersão completa em confinamento hipóxico de matriz de Ga 99.99% por sete dias, sem apresentar efeitos negativos em seu crescimento populacional (Contiliani *et al.*, 2020). Anteriormente, nematoides anidrobiontes *Ditylenchus dipsaci* foram alimentados com glicose radioativamente marcada e suas taxas respiratórias (*i.e.*, captação de O₂ e produção de CO₂) foram detectadas apenas após a reidratação (Barrett, 1982). Da mesma forma, rotíferos bdeloides dessecados sobreviveram em câmaras seladas contendo 99,99% de gás argônio puro ([O₂] < 0.0004%) por vinte e um dias (Orstan, 1998). Finalmente, estudos de simulação computacional calculam que a quantidade de água remanescente em células anidrobiontes secas (*i.e.*, 0.1g/g massa seca) é insuficiente para manter células metabolicamente ativas (Clegg, 1978; Potts, 1994).

Os estudos mencionados sugerem fortemente a ausência de metabolismo durante a anidrobiose. No entanto, esta é ainda uma questão pouco aceita pela comunidade

científica, e implica nos conceitos que temos a respeito de vida e morte. Sendo assim, estudos adicionais são necessários para subsidiar a mudança de paradigma.

1.1.3 Engenharia anidrobiótica

O estudo e compreensão dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos da anidrobiose é de grande interesse de uma área em ascensão científica: a engenharia anidrobiótica (EA). A EA busca promover a tolerância ao estresse hídrico para estruturas biológicas (*e.g.*, células, tecidos, órgãos, e organismos inteiros), baseando-se na animação suspensa (de Castro AG, 2000).

A aplicação da EA se estende a diversas áreas do conhecimento. Na área médica, a aplicação dos princípios anidrobiontes poderia ser útil a biobancos, manutenção e transporte de estruturas biológicas diversas (Polge *et al.*, 1949; Saragusty e Loi, 2018). Estudos recentes demonstraram a capacidade de preservação enzimática no estado seco por mais de 370 dias, em temperatura ambiente, no interior de células tolerantes a dessecação (Kikuta *et al.*, 2017). Similarmente, o desenvolvimento de vacinas a seco capazes de serem armazenadas em temperatura ambiente também foi demonstrado (Alcock *et al.*, 2010). Na área agrícola, a expectativa é produzir plantas capazes de expressar genes relacionados a anidrobiose, de modo a amenizar os danos em épocas de estiagem e promover a estocagem de frutos a seco (França *et al.*, 2007; Farrant e Moore, 2011). Nesse sentido e de modo ainda mais ousado e intrigante, a EA aplicada a alimentos também poderia viabilizar viagens espaciais de longa duração, permitindo alimentos estocados a seco e criando sistemas de animação suspensa (revisto em Jönsson, 2007; Jönsson *et al.*, 2008; Horikawa *et al.*, 2008).

Finalmente, um dos estudos mais notórios na área, o rotífero anidrobionte *Habrotrocha elusa* foi artificialmente infectado por um fungo parasita não anidrobionte, *Rotiferophthora angustipora*. Uma vez que o parasita não resistiu ao ambiente isento de água, após a permanência em anidrobiose por quatro semanas o rotífero anidrobionte estava livre da infecção (Wilson e Sherman, 2010), apresentando a anidrobiose como via terapêutica.

1.2 O gene *daf-2*

A atuação do gene *daf-2* se relaciona com a via de regulação do metabolismo, desenvolvimento e longevidade, promovendo a sinalização endócrina e codificando um membro da família de receptores de insulina (Kimura *et al.*, 1997).

No modelo *C. elegans*, o gene *daf-2* codifica uma proteína receptora que sinaliza e direciona o desenvolvimento do organismo para entrada no estado anidrobiótico, *dauer*, ou a continuidade do seu ciclo (em larvas L3, L4 e adulto). Sua regulação se relaciona às condições ambientais (figura 4) e se dá de duas formas, descritas a seguir.

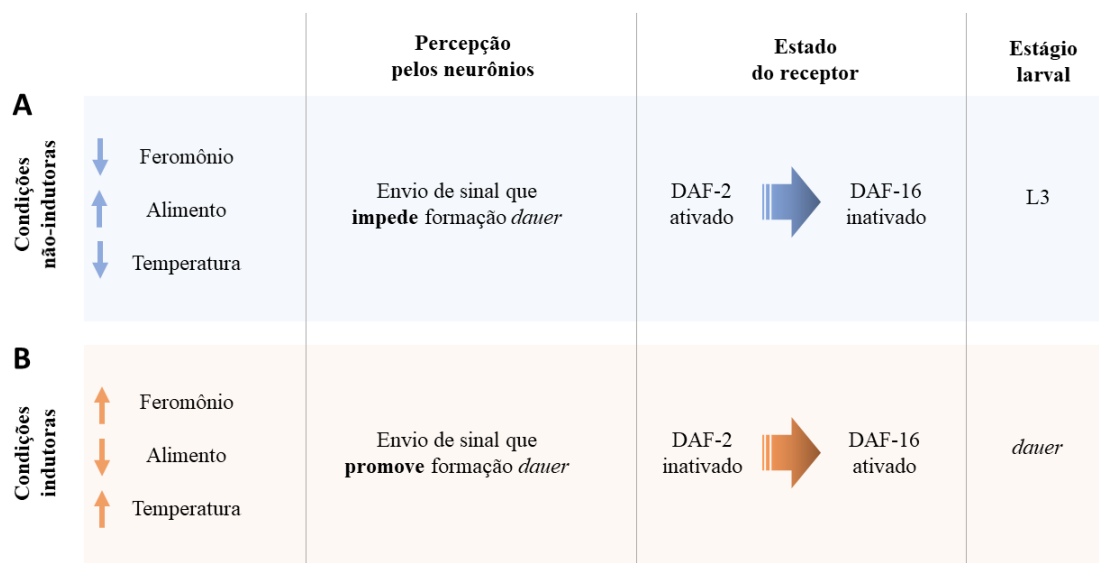


Figura 4. Condições de ativação e inativação do receptor DAF-2. Legenda: (A) Ativação de DAF-2; (B) Inativação de DAF-2. Adaptado de Gottlieb, S., e Ruvkun, G., 1994.

Inicialmente, vamos considerar um ambiente favorável (*i.e.*, com condições não-indutoras de *dauer*) para o desenvolvimento do organismo modelo, com presença de nutrientes, baixa temperatura e feromônios (figura 4A). As condições ambientais são identificadas por neurônios sensoriais que enviam um sinal para que o desenvolvimento prossiga. Nesse sentido, um peptídeo agonista semelhante a insulina é direcionado para o receptor DAF-2, ativando-o. A ativação de DAF-2 induz a ativação da proteína AGE-1. Esta atua catalisando a conversão de bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) em trifosfato de fosfatidilinositol (PIP₃). Em seguida, o PIP₃ se liga ao complexo AKT-1/AKT-2, expondo locais de fosforilação. Em paralelo, a quinase PDK-1 por ligação ao PIP₃, é recrutada para a membrana onde fosforila e ativa AKT-1. Por fim, a AKT-1 fosforila o fator de transcrição DAF-16. Uma vez fosforilado, o fator de transcrição DAF-16 é retido

no citoplasma da célula, impedido de adentrar no núcleo e fazer a leitura de genes que são importantes para resposta a estresse e anidrobiose (figura 5) (Ewbank, J., 2006; Gottlieb, S., e Ruvkun, G., 1994).

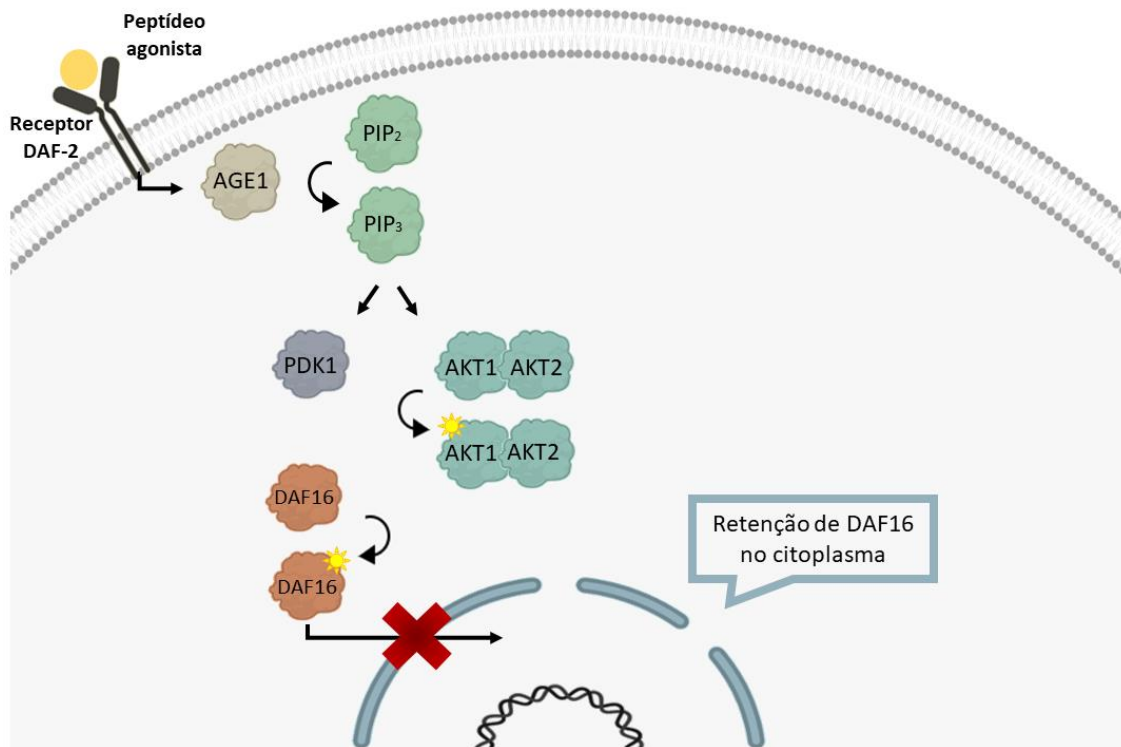


Figura 5. Via *daf-2* ativa. Adaptado Ewbank, J., 2006.

O segundo cenário é um ambiente com condições desfavoráveis para o desenvolvimento do organismo modelo (*i.e.*, com condições indutoras de *dauer*) com baixa de feromônios, altas temperaturas e poucos nutrientes (figura 4B). Da mesma forma, tais condições são percebidas por neurônios sensoriais, mas que dessa vez, sinalizam a necessidade de diapausa. Assim, um antagonista é enviado para se ligar ao receptor DAF-2, inviabilizando toda a cascata de ativação mencionada anteriormente e assim, não fosforilando o fator de transcrição DAF-16. Uma vez livre, DAF-16 adentra no núcleo celular e efetiva a regulação de um conjunto de genes de resposta à diversos estresses (Powell-Coffman, J. A., 2010) cujo produto (*e.g.*, enzimas gliceraldeído-3-fosfato e hidrogenases), são alvos da ativação de DAF-16 e são necessárias para resistência hipóxica mediada por DAF-2 (figura 6) (Mendenhall, A.R., LaRue, B., & Padilla, P. A., 2006). O mesmo ocorre em mutantes constitutivos do gene *daf-2* (*daf-c*), e

nesse caso, o organismo é capaz de adentrar em anidrobiose durante qualquer estágio larval (Gottlieb, S., e Ruvkun, G., 1994).

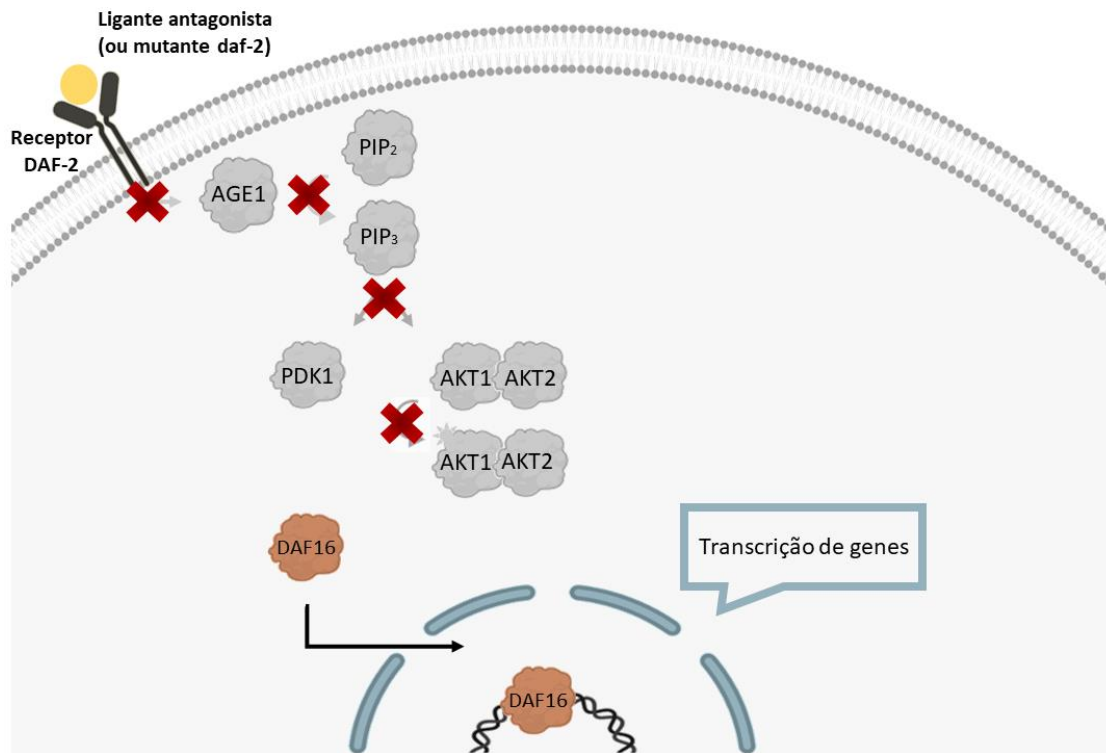


Figura 6. Via *daf-2* inativa. Adaptado Ewbank, J., 2006.

Atualmente, uma série de questionamentos a respeito do gene *daf-2* estão em aberto, e não se sabe como a expressão gênica e as alterações metabólicas estão envolvidas com o mecanismo pelo qual o animal mutante *daf-2* sobrevive ao estresse (Mendenhall, A. R., LaRue, B., & Padilla, P. A., 2006).

Além disso, considerando que *daf-2* tem um papel fundamental para a anidrobiose em *C. elegans*, o consideramos um bom alvo para investigação, a fim de identificar possíveis divergências e assinaturas moleculares de anidrobiontes.

1.3 Câmara de N₂

O nitrogênio foi descoberto em 1772 por Daniel Rutherford (Weeks, 1934). Embora sua descoberta seja atribuída a Rutherford, os químicos Antonie Lavoisier e Carl Wilhelm Scheele também investigavam o elemento durante esse mesmo período, e o

apelidaram de “gás azote” – sem vida, como resultado de uma das características mais importantes do N₂ para nosso contexto: incapacidade do gás de sustentar vida.

O nitrogênio, símbolo N e número atômico sete, é o elemento mais leve do grupo 15 da tabela periódica. Naturalmente encontrado em sua forma gasosa, N₂, compreende aproximadamente 78% da atmosfera, e é considerado inerte por dificilmente reagir com outros elementos (Banks, 1990).

Devido às características físico-químicas e considerando que animais não conseguem obtê-lo diretamente do ar, o N₂ atua apenas deslocando o ar natural, e por isso é amplamente utilizado como meio de inertização na indústria e para mimetizar anóxia no contexto científico (Xia, Y. *et al.*, 2018; Holowach-Thurston *et al.*, 1974; Steyaert, M., *et al.*, 2007).

Nessa pesquisa, utilizamos uma câmara com constante fluxo de N₂ puro para avaliar o efeito da anóxia e averiguar o (a)metabolismo de *P. superbus* durante anidrobiose.

2. Hipótese

2.1 *Hipótese do trabalho*

Considerando as características do estado anidrobiótico, bem como a tolerância dos organismos capazes de adentrar neste, nossa hipótese é que a anidrobiose é um estado verdadeiramente ametabólico (*i.e.*, sem demanda oxigênio) e assim, que o nematoide *P. superbis* tolera a exposição em ambiente anóxico por um, três e seis meses.

Adicionalmente, hipotetizamos que a estrutura primária e terciária da proteína DAF-2 de organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes apresenta divergências devido à importância desta no cenário de dessecação extrema.

3. Objetivos

3.1 *Objetivos*

3.1.1 *Objetivos gerais*

Investigar a natureza metabólica do estado anidrobiótico e a tolerância de *P. superbus* quando exposto em ambiente anóxico por longo prazo e avaliar a importância da proteína DAF-2 em cenário de dessecação extrema, buscando identificar similaridades e divergências estruturais e físico-químicas entre organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes.

3.1.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a viabilidade do nematoide *P. superbus* dessecado após um, três, e seis meses de exposição em câmara de nitrogênio;
- Identificar divergências na composição da proteína DAF-2 de espécies anidrobiontes e espécies não-anidrobiontes;
- Identificar divergências estruturais primárias e terciárias de DAF-2 de espécies anidrobiontes e não-anidrobiontes;
- Gerar modelos tridimensionais da proteína DAF-2 de espécies animais de organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes e buscar eventuais diferenças estruturais.

4. Materiais e Métodos

4.1 Manutenção de nematoides

Os nematoides *P. superbus* foram mantidos a 15 °C (manutenção) e 20 °C (cultivo) em estufa, na ausência de luz, em placas de Petri contendo meio de cultura ágar NGM (*Nematode Growth Medium*) coberto com uma camada de bactérias *Escherichia coli*, linhagem OP50, para alimentação.

4.2 Obtenção de *P. superbus*

Populações mistas (machos e fêmeas em diversos estágios de desenvolvimento) foram coletadas via adição de 5 mL de tampão M9 em placa de Petri de 9 cm de diâmetro. Os nematoides foram deslocados com o uso da pipeta, depositados em um tubo de ensaio de 50 mL, adicionando-se 5 mL de tampão M9. Após 10 minutos, o sobrenadante foi retirado, adicionando-se 10 mL de tampão M9. Esse passo foi reproduzido três vezes para retirar o excesso de bactérias. Em seguida, fez-se contagem de número de vermes e definiu-se a concentração para a etapa seguinte.

4.3 Ensaio de dessecação

Os nematoides foram depositados em membrana Supor 0.45 µm (Sigma-Aldrich), imobilizados por filtração a vácuo e depositados em microtubos de 1,5 mL, sem tampa. Em seguida, os microtubos contendo as membranas foram alojados em câmaras seladas que proporcionaram diferentes umidades relativas (UR) por 24 h, e a 20 °C, a fim de induzir a anidrobiose.

Dessa forma, inicialmente na etapa de pré-condicionamento, os tubos foram mantidos em câmara com solução saturada de CuSO₄ a 98% de UR. Em seguida, na etapa de dessecação, os tubos foram transferidos para câmara contendo sílica gel a 10% de UR. Para a etapa de reidratação, os tubos foram mantidos em câmara contendo água destilada a 99% de UR. Por fim, para a etapa de reidratação, adicionou-se 1mL de tampão M9 nos microtubos.

4.4 Exposição em câmara anóxica

Para o experimento de anóxia, as amostras desseçadas foram alojadas em tubos de 50 mL contendo sílica gel e transportadas. O organismo modelo foi exposto por um,

três, e seis meses em câmara de N₂ no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/CNPEM), em parceria com o Prof. Dr. Douglas Galante.

A condição de anóxia da câmara foi garantida por um sistema de fluxo livre de N₂ puro. Após abertura da câmara para retirada de amostra, aumentava-se o fluxo de N₂ puro pelo período de 1 h para viabilizar e acelerar a troca de O₂ (ou quaisquer outros gases que eventualmente tenham entrado) por N₂, resultando em uma concentração atmosférica dentro da câmara superior a 99% de N₂. Para garantir esse cenário, a sílica gel foi mantida nos tubos.

Paralelamente, os organismos do grupo controle foram mantidos em anidrobiose e em atmosfera natural, pelo período de um, três, e seis meses. Dessa forma, o trabalho contou com dois grupos experimentais: amostras expostas em câmara de N₂ por um, três, e seis meses (N1, N3, e N6); e controle negativo exposto em atmosfera natural por um, três, e seis meses (C1, C3, e C6). Da mesma forma, as amostras também ficaram alojadas em tubos de 50mL contendo sílica gel – caso contrário, a umidade do ar faria com que o nematoide saísse do estado de anidrobiose.

4.5 Ensaio de viabilidade

Para investigar a viabilidade dos nematoides após os tratamentos, realizamos um ensaio de sobrevivência (Evangelista *et al.*, 2017). Após a exposição a N₂ e pré-reidratação, adicionou-se 1 mL de corante Eritrosina B (0,4% p/v em tampão M9) (Sigma-Aldrich) em cada amostra. Após 1 h, as amostras foram lavadas três vezes com tampão M9, para remover o excesso de corante. Os vermes corados (total ou parcialmente) após o procedimento são considerados mortos, enquanto os não corados são considerados vivos. Considerando o número de vermes mortos e vivos, foi feito o cálculo da viabilidade, apresentado em seguida (1).

$$\frac{n^{\circ} \text{ de nematoides vivos}}{n^{\circ} \text{ total de nematoides}} \times 100 = \text{viabilidade} \quad (1)$$

4.6 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em triplicatas técnicas, permitindo a elaboração das médias e desvios-padrão para análises estatísticas por meio dos testes “One Way ANOVA” e “Tukey”, tendo como corte $p \leq 0.05$.

4.7 Análises *in silico*

4.7.1 Obtenção de sequências de DAF-2

Foram obtidas via BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), na plataforma do NCBI, as sequências FASTA de proteínas homólogas a proteína codificada por *daf-2* em *C. elegans* (NCBI ID: NP_001299917.1) de organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes.

Para amenizar a margem de erros, consideramos sequências taxonomicamente equivalente entre os grupos. Dessa forma, tanto para anidrobionte, quanto para não-anidrobionte foram utilizadas: três sequências de animais, cinco de plantas, e duas de fungos (tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Sequências de organismos não-anidrobiontes

Não-anidrobiontes		
Reino	Espécies	NCBI ID
Animalia	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAC47458.1
	<i>Mus musculus</i>	AAA39318.1
	<i>Homo sapiens</i>	AAI17173.1
Plantae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564913.1
	<i>Oryza sativa</i>	AAO72550.1
	<i>Hordeum vulgare</i>	BAJ95414.1
	<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016514206.1
	<i>Zea mays</i>	XP_008646798.1
Fungi	<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_681530.1
	<i>Neurospora crassa</i>	XP_011392829.1

Tabela 2. Sequências de organismos anidrobiontes

Anidrobiontes		
	Espécies	NCBI ID
Animalia	<i>Artemia franciscana</i>	ACJ63722.1
	<i>Panagrolaimus superbus</i>	GW410933.1
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001299917.1
Plantae	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	AME15293.1
	<i>Welwitschia mirabilis</i>	AHZ63853.1
	<i>Selaginella lepidophylla</i>	AML76286.1
	<i>Physcomitrella patens</i>	AKZ66494.1
	<i>Syntrichia caninervis</i>	AHZ58490.1
Fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_009718.3
	<i>Schizopyllum commune</i>	XP_003037030.1

4.7.2 Análise de composição de DAF-2

Para averiguar possíveis divergências na composição da proteína DAF-2 entre não-anidrobiontes e anidrobiontes, submetemos as sequências a análise de composição via o *software* GeneRunner (Spruyt e Buquicchio, 1994). Dessa forma, analisamos o percentual de cada aminoácido e assim suas respectivas característica físico-química (ácido, básico, polar e apolar) para cada grupo (anidrobiontes e não-anidrobiontes).

4.7.3 Alinhamento múltiplo de sequências

As sequências obtidas foram alinhadas no *software* online Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) com configurações padrão (Sievers *et al.*, 2011). Os resultados foram visualizados no *software* JalView (Clamp *et al.*, 1998), com parâmetros de 100% de similaridade residual, considerando alinhamentos de ambos os grupos (separadamente) e de todas os organismos (geral).

4.7.4 Análise de razão

As sequências foram submetidas a análise de predominância de aminoácidos de determinada posição em relação ao grupo oposto. Assim, utilizamos o *software* JalView (Clamp *et al.*, 1998) e ajustamos o parâmetro de conservação para avaliar a razão. O cálculo foi feito dividindo o número de organismos que conservavam determinado aminoácido ao longo da proteína DAF-2 pelo mesmo dado no grupo oposto. Consideramos aquelas posições cuja razão $\geq 6,0$ (2).

$$\frac{n^{\circ} \text{ de anidrobiontes que conservam o aminoácido}}{n^{\circ} \text{ de não - anidrobiontes que conservam o aminoácido}} = \text{razão} \quad (2)$$

4.7.5 Substituição de aminoácidos

Para investigar o efeito dos aminoácidos divergentes nas espécies *Welwitschia mirabilis* e *Selaginella lepidophylla*, alteramos manualmente a sequência primária do domínio quinase. Foram feitas as seguintes substituições:

Tabela 3 Substituições de aminoácidos

Seq. Referência (<i>C. elegans</i>)	1282E	1328G	1339H	1356K	1361G	1403S
<i>Welwitschia mirabilis</i>	D817E	A851G	Y862H	Q879K	D884G	A952S
<i>Selaginella lepidophylla</i>	D407E	A441G	Y452H	L469K	D474G	A545S

4.7.6 Modelagem *ab initio*

Utilizando as sequências primárias obtidas anteriormente, as estruturas terciárias do domínio quinase da proteína codificada por *daf-2* em animais foram obtidas *ab initio* via I-TASSER (Zhang, 2008). De modo adicional, as estruturas originais e editadas das plantas *W. mirabilis* e *S. lepidophylla* também foram obtidas.

O servidor I-TASSER gera como parâmetro de confiança para os modelos tridimensionais o índice C-score [-5,2] (Zhang, 2008), sendo que quanto maior o C-score, mais confiável a predição.

4.7.7 Parâmetros de qualidade

A qualidade das estruturas terciárias geradas foi avaliada de acordo com os programas de validação PROCHECK, ERRAT, Verify 3D, e ProSA-web (Laskowski, *et al.*, 1993; Colovos & Yeates 1993; Eisenberg & Bowie 1997; Wiederstein & Sppl 2007).

PROCHECK avalia a qualidade estereoquímica da estrutura proteica. ERRAT analisa interações atômicas do modelo predito e as compara com estruturas de alta resolução. O programa Verify 3D avalia o perfil de pseudoenergia, determinando a compatibilidade de um modelo atômico com sua própria sequência de aminoácidos, e compara os resultados com estruturas de alta resolução. Finalmente, o programa ProSA-web compara a qualidade geral da estrutura modelada com estruturas validadas experimentalmente. O refinamento das estruturas geradas foi feito via GalaxyRefine (Heo & Seok 2013).

4.7.8 Sobreposição de modelagens

Para identificar diferenças estruturais entre os modelos tridimensionais de não-anidrobiontes e anidrobiontes resultantes da modelagem *ab initio*, todos estes foram sobrepostos entre si, via PyMOL, cujo parâmetro de similaridade é validado pelos valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) em ångström (Å) – quanto menor o valor de RMSD, mais similares são as estruturas sobrepostas, sendo nosso parâmetro o limiar máximo de 3.0 Å (Maiorov & Crippen, 1995).

5. Resultados

5.1 Análises *in silico*

5.1.1 Análise de composição de DAF-2

O gráfico da figura 7 apresenta o percentual de aminoácidos ácidos, básicos, apolares e polares da proteína DAF-2 em organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes. Identificamos que a proteína de organismos anidrobiontes é significativamente mais básica que o grupo oposto (diferença indicada pela barra e asterisco).

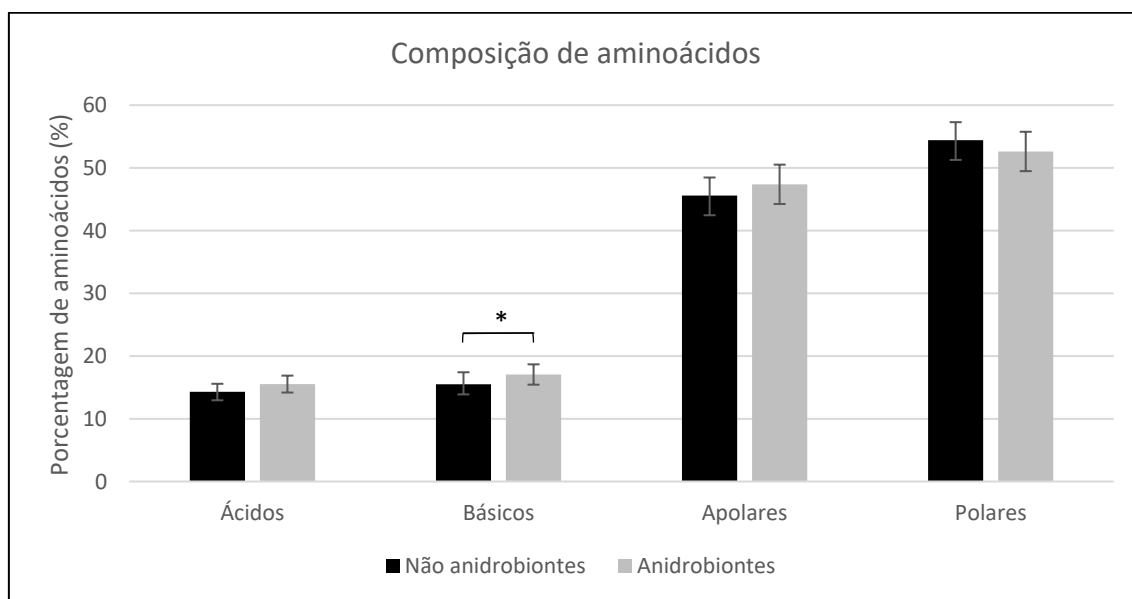


Figura 7. Característica físico-química de DAF-2. Legenda: Percentual de aminoácidos de determinada classe físico-química presente em não-anidrobiontes (barras escuras) e anidrobiontes (barras claras). O asterisco representa diferença significativa ($p < 0.05$).

5.1.2 Análise de razão

A predominância de aminoácidos foi investigada considerando os aminoácidos que apresentaram razão $\geq 6,0$. O resultado dessa análise está ilustrado no gráfico da figura 8, a seguir.

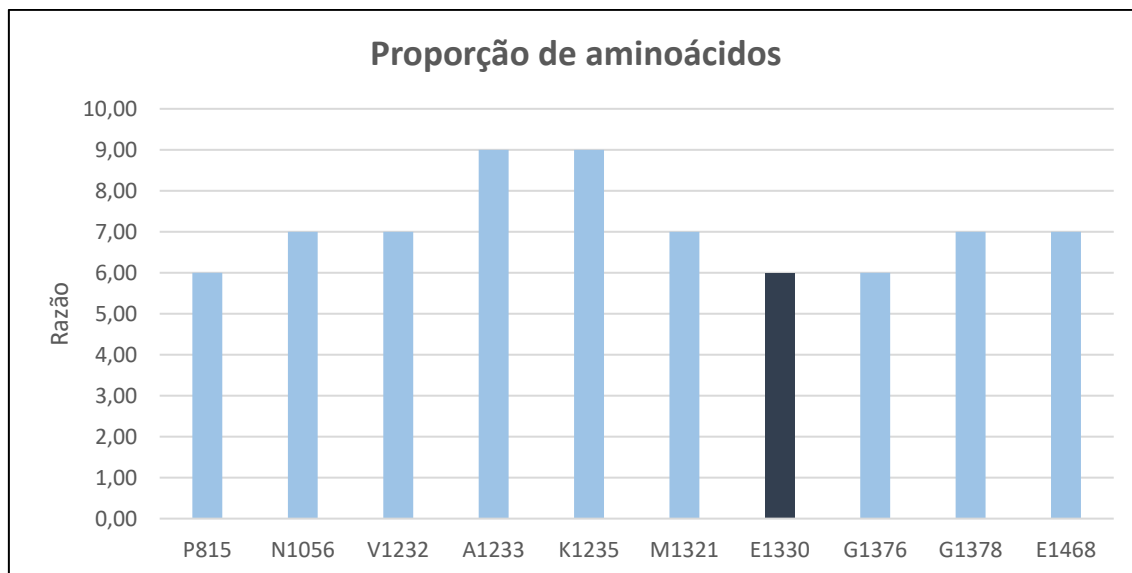


Figura 8. Razão entre aminoácidos conservados. Aminoácidos em maiores proporções (razão $\geq 6,0$; colunas em azul) em organismos não-anidrobiontes; e aminoácido em maior proporção (razão $\geq 6,0$; coluna em azul escuro) em organismos anidrobiontes. Legenda: prolina -P815; asparagina - N1056; valina - V1232; alanina - A1235; metionina - M1321; lisina - K1235; ácido glutâmico - E1330; glicina - G1376 / G1378; ácido glutâmico - E1468.

5.1.3 Alinhamentos múltiplos de sequências

As figuras 09, 10 e 11 mostram os alinhamentos do domínio quinase proteína DAF-2 realizados via Clustal Omega, considerando o parâmetro de 100% de similaridade físico-química e os seguintes grupos: i) anidrobiontes; ii) não-anidrobiontes e iii) geral.

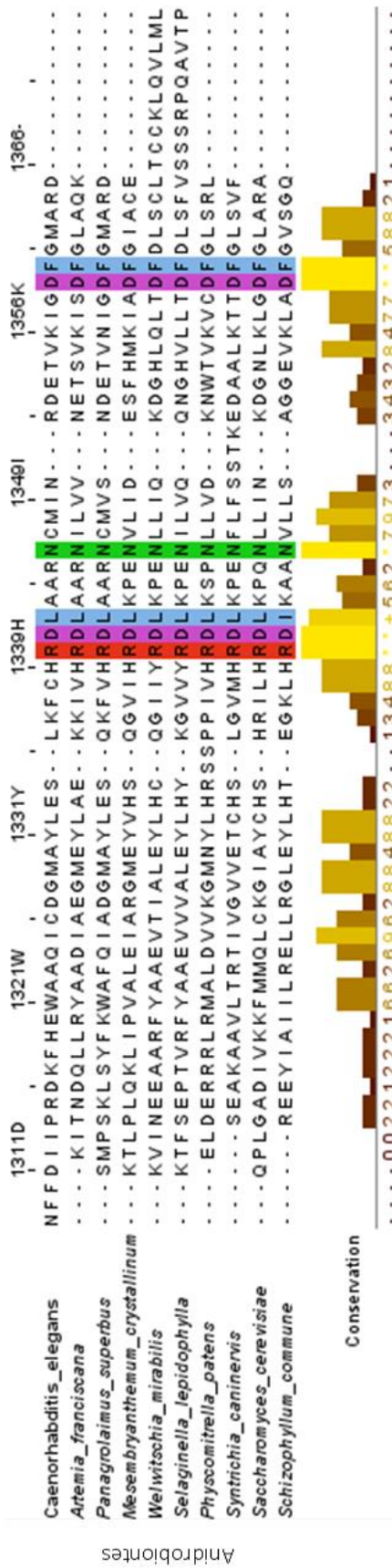
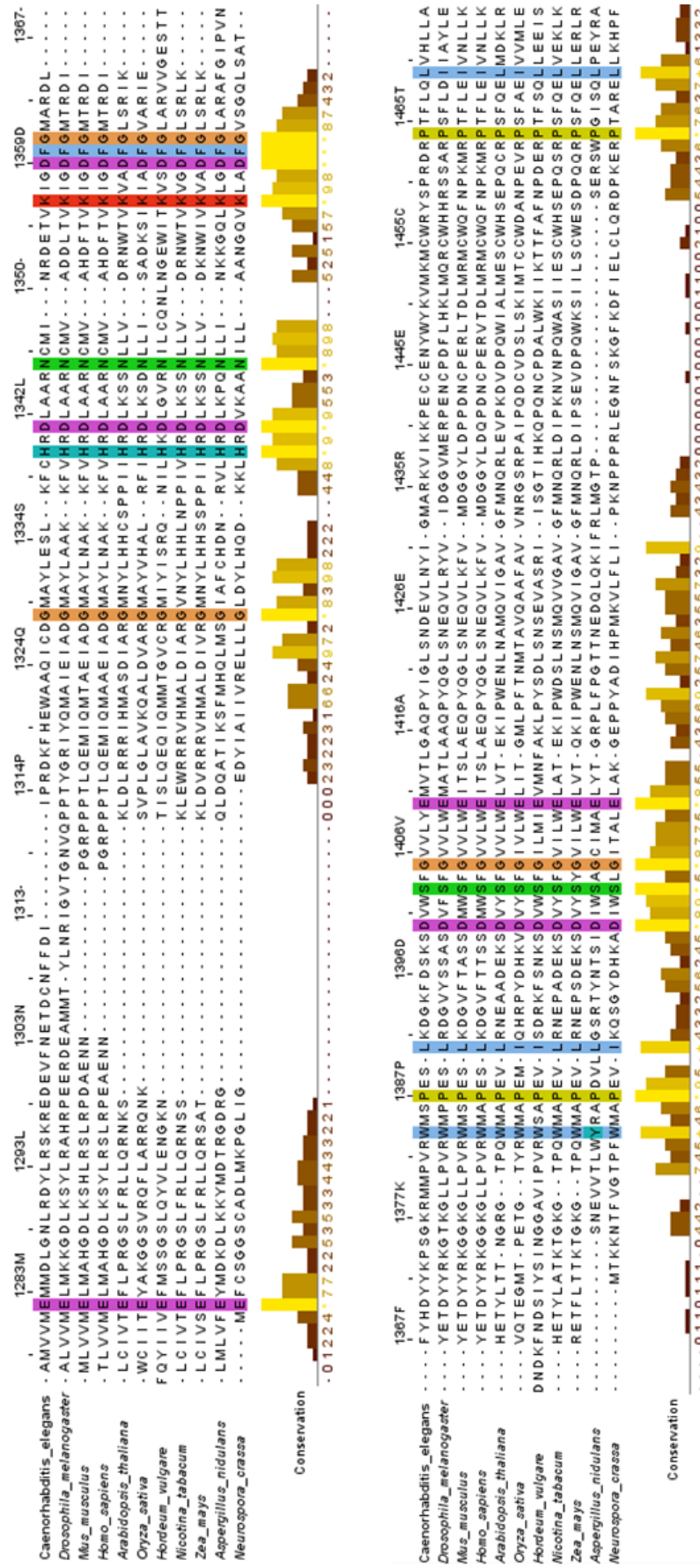


Figura 9. Alinhamento e conservação de seqüências primárias de anidrobiontes. Visualização via Jalview dos alinhamentos múltiplos de seqüências de organismos anidrobiontes, com conservação por similaridade físico-química de 100% (representados por diferentes cores).



Naõ anidrobiontes

Figura 10. Alinhamento e conservação de sequências primárias de não-anidrobiontes. Visualização via Jalview dos alinhamentos múltiplos de sequências de organismos não-anidrobiontes, com conservação por similaridade físico-química de 100% (representados por diferentes cores).

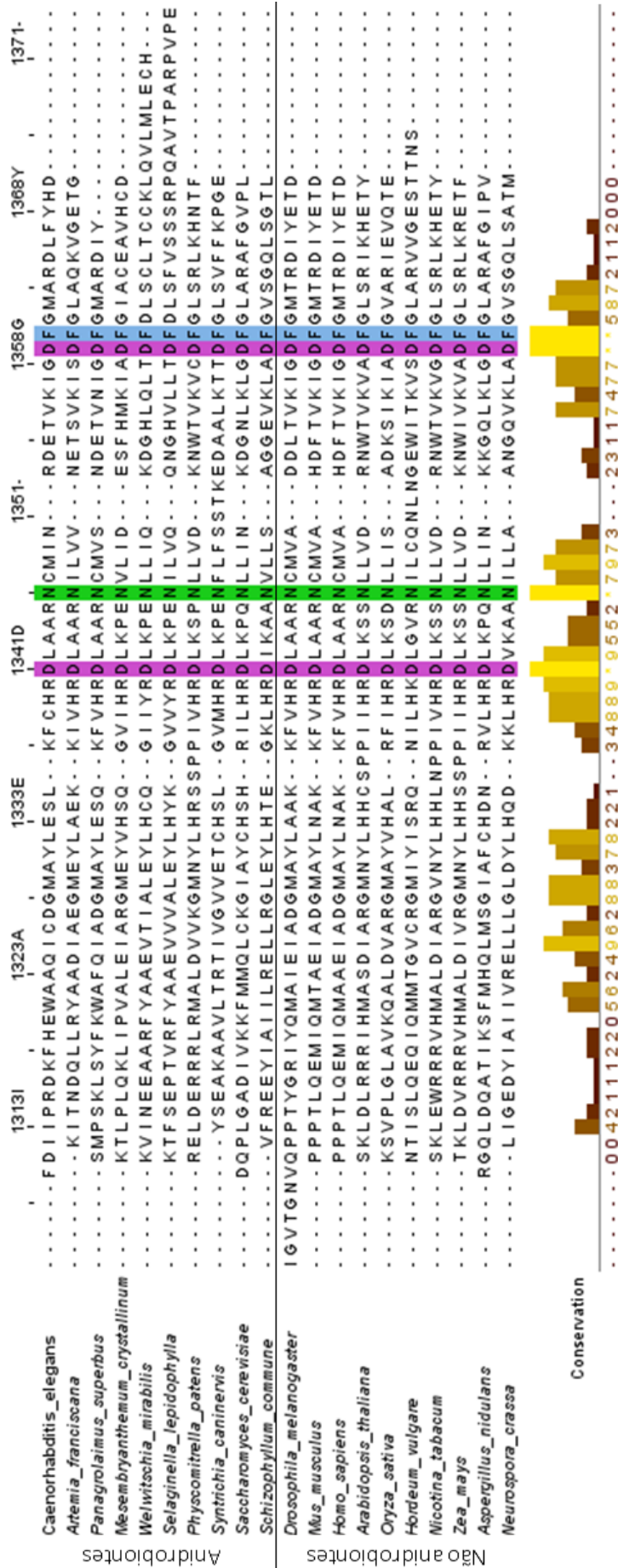


Figura 11. Alinhamento e conservação de sequências primárias geral. Visualização via Jalview dos alinhamentos múltiplos de seqüências de organismos anidriobiontes e não-andriobiontes, com conservação por similaridade físico-química de 100% (representados por diferentes cores).

5.1.4 Modelagem *ab initio*

A figura 12 apresenta a modelagem estrutural do domínio quinase da proteína DAF-2 de animais anidrobiontes e não-anidrobiontes. Cada estrutura modelada foi submetida ao refinamento da cadeia lateral e relaxamento geral da estrutura por meio do servidor GalaxyRefine, a apresentam o índice C-score [0-1], entre 0.24 – 0.90.

Em seguida, a figura 13 apresenta a modelagem estrutural do domínio quinase da proteína DAF-2 dos organismos *W. mirabilis* e *S. lepidophylla* originais e editadas de acordo com a seção 4.7.5.

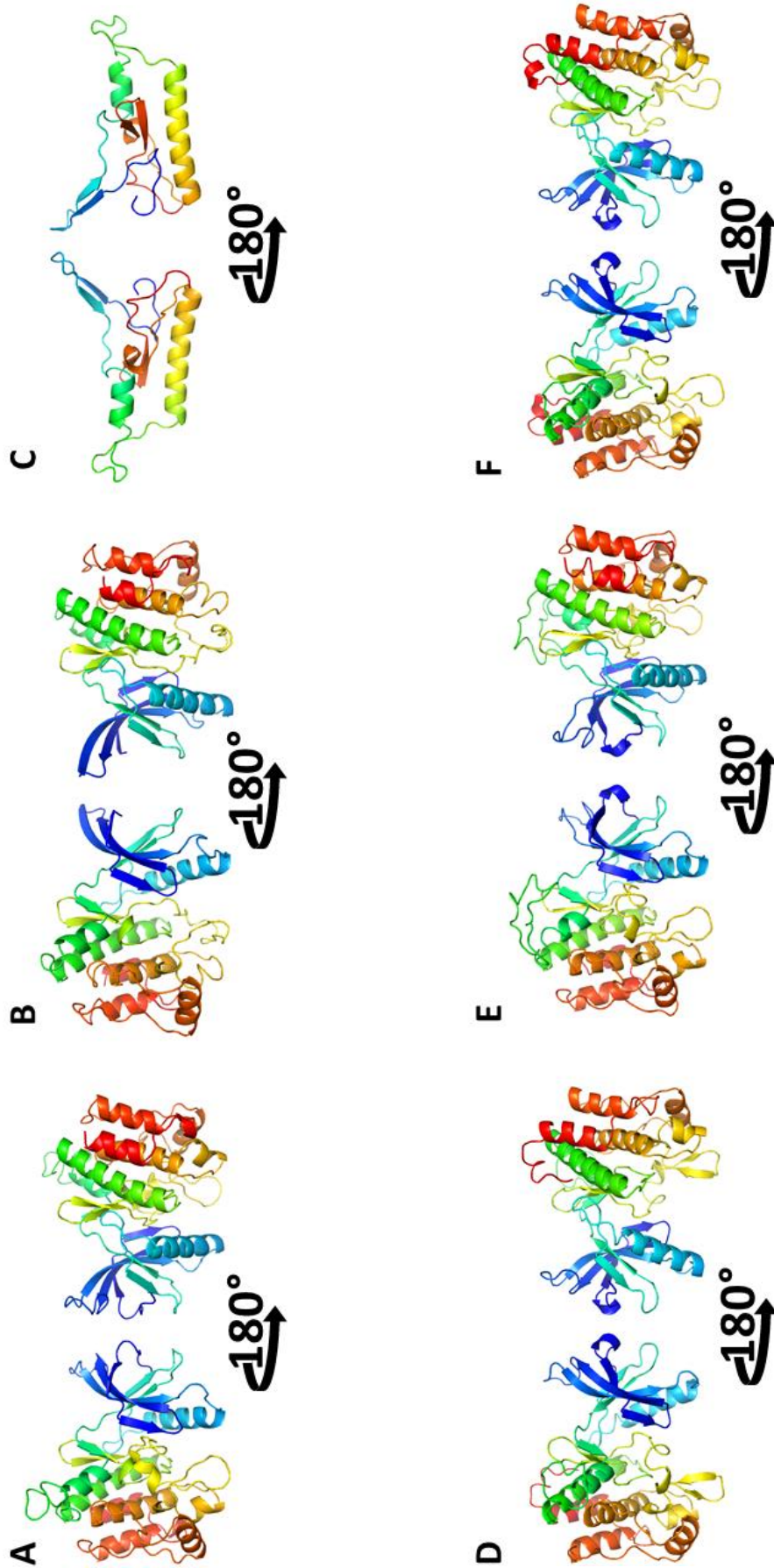


Figura 12. Estruturas do domínio quinase de animais anidrobiontes e não-anidrobiontes geradas *ab initio*. Legenda: Organismos anidrobiontes (acima) A – C. *elegans* (C-score=0.90); B - *A. franciscana* (C-score=0.77); C - *P. superbis* (C-score=0.24; Organismos não-anidrobiontes (abaixo) D – *H. sapiens* (C-score=0.78); E – *D. melanogaster* (C-score=0.83); F – *M. musculus* (C-score=0.59).

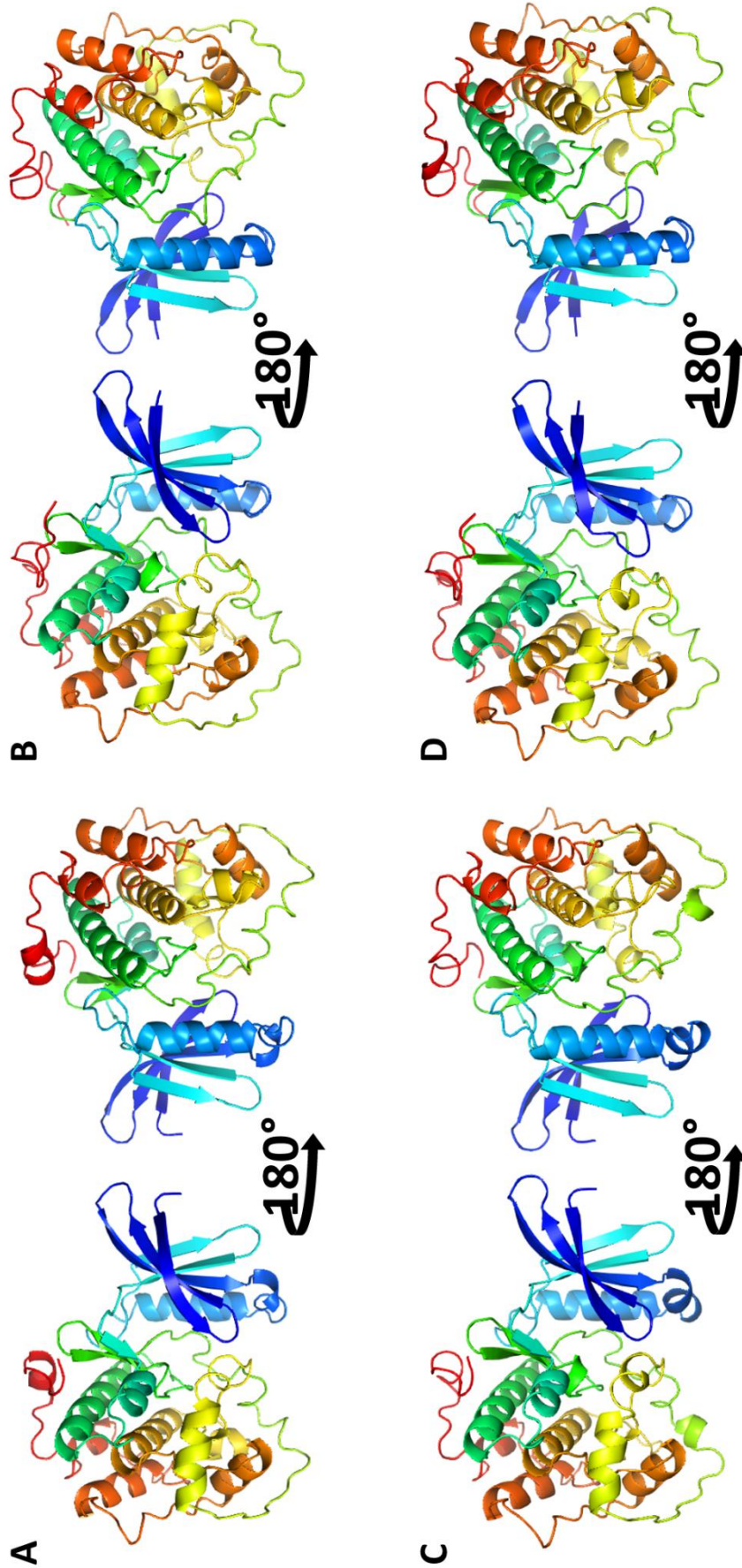


Figura 13. Estruturas do domínio quinase de *W. mirabilis* e *S. lepidophylla* geradas *ab initio*. Legenda: estruturas originais (acima) A – *W. mirabilis* (C-score=0.80); B – *S. lepidophylla* (C-score=1.31); estruturas editadas (abaixo) C – *W. mirabilis* (C-score=0.80); D – *S. lepidophylla* (C-score=1.20).

5.1.5 Parâmetros de qualidade

Após o refinamento, todas as modelagens estruturais geradas foram submetidas aos parâmetros de qualidade. A tabela 4 apresenta os resultados das validações, de modo que todas estão adequadas com no mínimo um dos parâmetros de qualidade.

Tabela 4. Resultados dos parâmetros de qualidade.

		Farrowed regions	Overall quality-factor	Averaged 3D	Z-score
	<i>C. elegans</i>	90.90%	91.76*	86.97%	-7.61
	<i>P. superbus</i>	90.80%	98.88	75.23%*	-3.85
	<i>A. franciscana</i>	91.20%	95.79	90.70%	-7.67
	<i>H. sapiens</i>	93.20%	94.42*	97.57%	-9.24*
	<i>M. musculus</i>	92.70%	95.22	89.58%	-9.30*
	<i>D. melanogaster</i>	91.30%	93.35	93.43%	-8.28
		Farrowed regions	Overall quality-factor	Averaged 3D	Z-score
Seq. original	<i>W. mirabilis</i>	91.6%	93.07*	80.78%	-7.55
	<i>S. lepidophylla</i>	92.9%	90.16*	79.49%*	-6.95*
Seq. editada	<i>W. mirabilis</i>	94.5%	84.58*	82.74%	-7.55
	<i>S. lepidophylla</i>	92.5%	92.12*	73.80%*	-6.88*

Legenda: Acima animais anidrobiontes e não-anidrobiontes. Abaixo plantas anidrobiontes cujo aminoácidos foram substituídos manualmente. Os valores acompanhados de asterisco indicam que o limiar de qualidade naquele parâmetro não foi atingido.

5.1.6 Sobreposição de modelagens

As sobreposições de estruturas terciárias do domínio quinase da proteína DAF-2 são apresentadas a seguir (figuras 14,15 e 16). Realizamos a sobreposição considerando os grupos i) animais anidrobiontes, ii) animais não-anidrobiontes e iii) animais anidrobiontes e não-anidrobiontes. Todas as sobreposições, entre os organismos e entre os grupos apresentaram valores de RMSD entre 0.410 – 1.120Å.

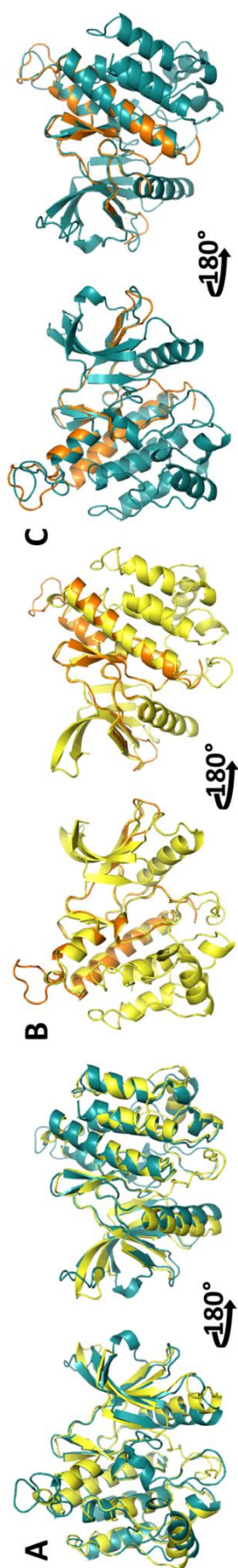


Figura 14. Alinhamento de estruturas terciárias do domínio quinase de DAF-2 de organismos anidrobiontes. Legenda: A - *A. franciscana* (amarelo) e C. *elegans* (ciano); B - *A. franciscana* (amarelo) e *P. superbus* (laranja); C - *C. elegans* (ciano) e *P. superbus* (laranja).



Figura 15. Alinhamento de estruturas terciárias do domínio quinase de DAF-2 de organismos não-anidrobiontes. Legenda: A - *D. melanogaster* (rosa) e *H. sapiens* (azul); B - *D. melanogaster* (rosa) e *M. musculus* (verde); C - *H. sapiens* (azul) e *M. musculus* (verde).

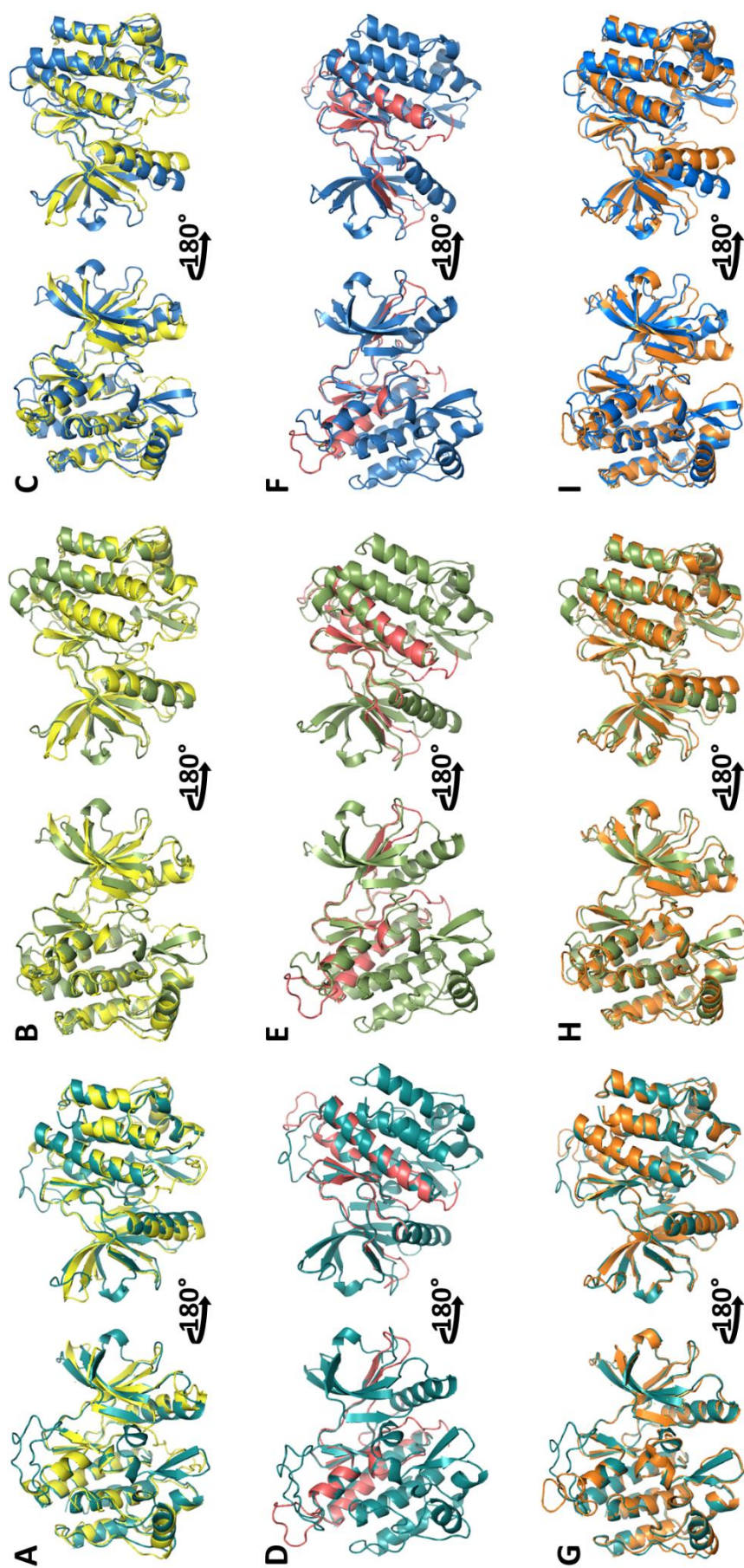


Figura 16. Alinhamento geral de estruturas terciárias do domínio quinase de DAF-2. Legenda: A - *A. franciscana* (amarelo) e *D. melanogaster* (ciano); B - *A. franciscana* (amarelo) e *M. musculus* (verde); C - *A. franciscana* (amarelo) e *H. sapiens* (rosa) e *D. melanogaster* (ciano); E - *P. superbus* (rosa) e *M. musculus* (verde); F - *P. superbus* (rosa) e *H. sapiens* (azul); G - *C. elegans* (laranja) e *D. melanogaster* (ciano); E - *C. elegans* (laranja) e *M. musculus* (verde); F - *C. elegans* (laranja) e *H. sapiens* (azul).

A figura 17 apresenta a sobreposição da modelagem do domínio quinase editado e original das plantas anidrobiontes *W. mirabilis* e *S. lepidophylla*.

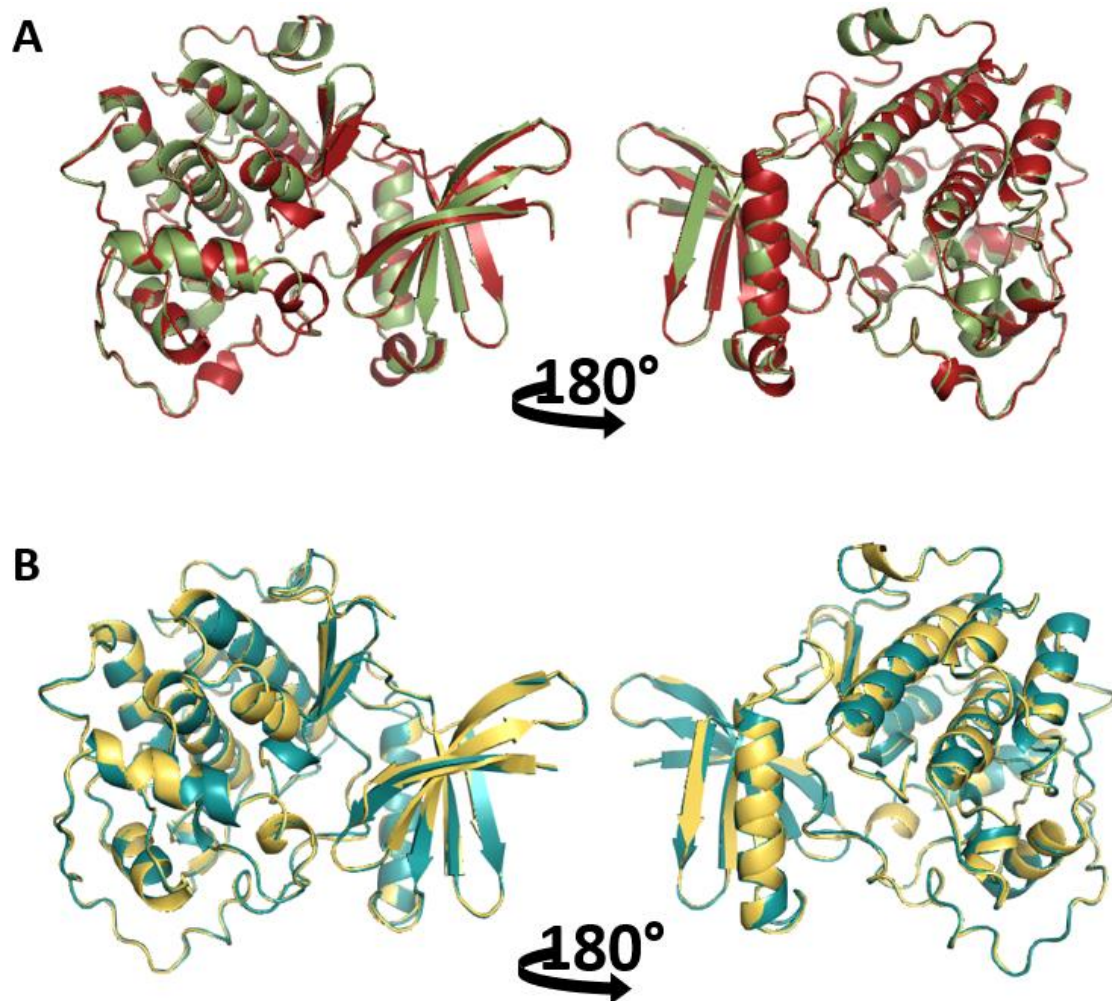


Figura 17. Alinhamento de estruturas editadas e originais do domínio quinase de *W. mirabilis* e *S. lepidophylla*. (A) domínio quinase editado (vermelho) e original (verde) de *W. mirabilis*; (B) domínio quinase editado (amarelo) e original (ciano) *S. lepidophylla*, $RSMD = 0.206$.

As tabelas 5, 6, 7 e 8 apresentam os dados de RMSD (Å) resultante das sobreposições de todas as estruturas terciárias. Os dados indicam valores consideravelmente abaixo do limiar, 3.0 Å, sugerindo semelhança estrutural entre o domínio quinase dos organismos.

Tabela 5. Alinhamento de estruturas tridimensionais de organismos anidrobiontes.

Alinhamento entre organismos anidrobiontes			
	RMSD (Å)		
	<i>C. elegans</i>	<i>P. superbus</i>	<i>A. franciscana</i>
<i>A. franciscana</i>	0.819	0.472	-
<i>P. superbus</i>	0.536	-	0.472
<i>C. elegans</i>	-	0.536	0.819

Tabela 6. Alinhamento de estruturas tridimensionais de organismos não-anidrobiontes

Alinhamento entre organismos não-anidrobiontes			
	RMSD (Å)		
	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>D. melanogaster</i>
<i>D. melanogaster</i>	1.057	0.771	-
<i>M. musculus</i>	0.521	-	0.771
<i>H. sapiens</i>	-	0.521	1.057

Tabela 7. Alinhamento geral de estruturas tridimensionais.

Alinhamento entre grupos			
	RMSD (Å)		
	<i>D. melanogaster</i>	<i>M. musculus</i>	<i>H. sapiens</i>
<i>A. franciscana</i>	0.725	0.855	0.998
<i>P. superbus</i>	0.533	0.807	0.904
<i>C. elegans</i>	0.410	0.829	1.120

Tabela 5. Alinhamento de estruturas tridimensionais editas e originais de plantas anidrobiontes

Alinhamento entre plantas anidrobiontes		
	RMSD (Å)	
	<i>S. lepidophylla</i> (edit)	<i>W. mirabilis</i> (edit)
<i>S. lepidophylla</i>	0.294	-
<i>W. mirabilis</i>	-	0.380

5.2 Exposição em câmara anóxica

5.2.1 Ensaio de viabilidade

Os percentuais de sobrevivência de *P. superbus* após exposição por diferentes períodos em condições distintas são representados no gráfico da figura 18. As amostras expostas em câmara de nitrogênio (N1, N3 e N6) foram dadas como estatisticamente equivalentes às respectivas amostras controle, mantidas em atmosfera natural (C1, C3, e C6). Entretanto, nota-se ao longo do período exposto um decaimento da viabilidade em dois grupos, e nesse sentido as amostras N1 (77,47%) e N6 (42,72%) diferem estatisticamente. Por fim, embora haja uma diferença percentual na viabilidade do grupo controle C1, C3 e C6 (cuja viabilidade é de 82,72%, 75,59%, e 69,49% respectivamente), esta não apresentou relevância estatística.

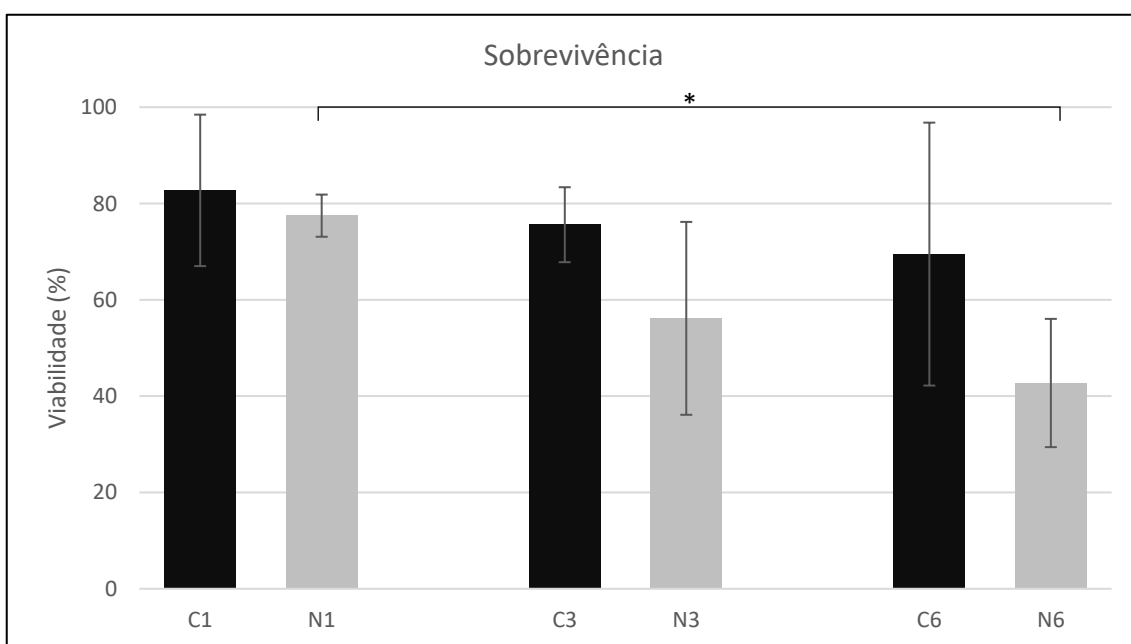


Figura 18: Viabilidade de *P. superbus*. Os percentuais de sobrevivência estão representados (eixo y) para cada grupo (eixo x). A barra com o asterisco indica diferença estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

6. Discussão

6.1 Análises *in silico*

Nós investigamos a estrutura primária e terciária da proteína DAF-2 em organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes. Inicialmente, identificamos que, de modo geral, a proteína codificada por *daf-2* em organismos anidrobiontes é 1,55% mais básica que a proteína codificada por *daf-2* em organismos não-anidrobiontes (figura 7). Em anidrobiontes, a proteína é enriquecida com aminoácidos como lisina, arginina e histidina, considerados hidrofílicos.

A natureza hidrofílica de determinados aminoácidos, como os mencionados acima, é resultado de interações de hidrogênio e interações eletrostáticas. A determinação estrutural e a estabilidade proteica durante a animação suspensa são garantidas por essas interações, e nesse sentido, o enriquecimento de aminoácidos básicos é um dado importante para o contexto anidrobionte, e sugestivamente necessária a ele.

Corroborando com nossos achados, investigação de dinâmica molecular da proteína LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), amplamente encontrada em organismos anidrobiontes, mostrou que conforme a perda de água aumenta (<10% em peso), gradualmente a proteína é dobrada. Notavelmente, os aminoácidos hidrofílicos foram identificados como aqueles que indicavam maior variação estrutural da proteína ao longo do tempo durante a entrada em anidrobiose. Ao avaliar as interações responsáveis, os pesquisadores concluíram que com o avanço da dessecação, as moléculas de água presentes na célula não eram suficientes para hidratar totalmente a proteína, de modo que o número de ligações de hidrogênio entre proteína e água presente na célula diminuiu, priorizando o número de ligações de hidrogênio intraproteína. No mesmo sentido, o grupo investigou as interações eletrostáticas, e notaram que a atração era dominante a repulsão, sugerindo que as interações eletrostáticas intraproteína promovem o dobramento da estrutura (Li e He, 2009). Considerando as interações físico-químicas da proteína LEA frente ao desafio da animação suspensa, acreditamos que a importância dos aminoácidos hidrofílicos identificados por nós, apresenta natureza semelhante.

Por outro lado, a posição 1330 de organismos anidrobiontes apresenta seis vezes mais resíduos ácidos (E) do que não-anidrobiontes (figura 8). A predominância de aminoácidos com tal característica físico-química é intrigante por diferir das características mencionadas anteriormente e esperadas, já que são sugestivas de marcas de organismos capazes de entrar em animação suspensa. Nesse sentido, postulamos que as razões encontradas entre anidrobiontes e não-anidrobiontes relacionem-se ao

distanciamento filogenético das espécies avaliadas, o que é naturalmente esperado considerando os diferentes organismos estudados (Rikke *et al.*, 2000).

O número de domínios da proteína DAF-2 conservado varia entre os organismos representantes, de modo que apenas o domínio quinase é preservado e compartilhado entre todos os amostrados. Considerando este domínio, e com o mesmo intuito de identificar marcas do estado de animação suspensa, investigamos as sequências primárias das espécies amostradas em ambos os grupos, anidrobiontes e não-anidrobiontes. Identificamos os aminoácidos conservados com total similaridade, ou seja, aqueles que pertenciam ao mesmo grupo físico-químico. Coincidentemente, os aminoácidos conservados por similaridade apresentavam também conservação por identidade: não apenas pertenciam ao mesmo grupo físico-químico, como tratavam-se exatamente do mesmo aminoácido. Quatro aminoácidos se destacaram considerando esse parâmetro: ácido aspártico (D1341; e D1359); asparagina (N1346) e fenilalanina (F1360) (figura 11). Embora esses aminoácidos amplamente conservados não se encontrem nos motivos do domínio (Kimura, *et al.*, 1997), a conservação ao longo da evolução entre as espécies é sugestiva, e esperado que desempenhem papel de importância e de modo fisiologicamente semelhante dentro do domínio e no contexto de atuação da proteína.

Paralelamente, a conservação por similaridade entre os organismos anidrobiontes mostrou que apenas o aminoácido arginina (R1340) é totalmente preservado (figura 9). Visto que, a princípio, este dizia respeito a um resíduo conservado apenas em organismos capazes de entrar em anidrobiose, seria intuitivo indicá-lo como suposto protagonista na adaptação a tal estado metabólico. Entretanto, a investigação da posição correspondente em organismos não-anidrobiontes, mostrou que apenas a espécie *Hordeum vulgare* apresenta aminoácido distinto da sequência anidrobionte (R1340K)(figura 10). Os resíduos arginina e lisina compartilham características físico-químicas, ambos são polares e com carga positiva, o que pontua pouca flexibilidade nessa posição do domínio quinase para alterações drásticas, como aminoácidos de classes físico-químicas divergentes.

As sequências primárias de não-anidrobiontes apresentaram uma conservação de resíduos entre as espécies superior ao grupo anterior, totalizando quinze aminoácidos com total similaridade, e coincidentemente, com total de identidade (figura 10). No mesmo sentido, ao avaliar as posições correspondentes em anidrobiontes, as espécies *Welwitschia mirabilise* e *Selaginella lepidophylla* se destacaram por apresentar maior diversidade de aminoácidos (*i.e.*, em ambos, 46,66%) em posições que no grupo não-anidrobionte há ampla conservação (1282E, 1328G, 1339H, 1356K, 1361G e 1403S) (apêndice A). Uma

vez que 83% (5/6) dessas substituições são idênticas entre essas duas espécies, e que ambas compartilham o clado *Tracheophyta*, uma hipótese é que tais divergências tenham a mesma origem evolutiva. Entretanto, a espécie *Mesembryanthemum crystallinum*, também compartilha o clado *Tracheophyta* com *W. mirabilis* e *S. lepidophylla*, porém não apresenta estas mesmas substituições, fragilizando tal interpretação. Isso se torna ainda mais problemático ao se observar que *M. crystallinum* e *W. mirabilis* são mais próximas filogeneticamente entre si (mesmo clado *Spermatophyta*) do que com *S. lepidophylla*. Portanto, destacamos que esses curiosos dados são dignos de estudos posteriores mais aprofundados.

Uma forma de investigar o efeito estrutural das variações de aminoácidos na estrutura terciária do domínio quinase entre as espécies, é gerar estruturas tridimensionais *ab initio* (figuras 12 e 13) e alinhá-las (figuras 14, 15 e 16). A qualidade desses modelos estruturais obtidos *ab initio* via I-TASSER reflete nos valores de *C-score* e demais parâmetros de qualidade aplicados, indicando confiança as análises subsequentes (Laskowski, *et al.*, 1993; Colovos & Yeates 1993; Eisenberg & Bowie 1997; Wiederstein & Sppl 2007; Heo & Seok 2013; Zhang, 2008).

Adicionalmente, de acordo com os dados de RMSD resultantes dos alinhamentos destes modelos entre animais anidrobiontes e não-anidrobiontes (tabelas 5, 6, 7 e 8), mesmo espécies distantes filogeneticamente apresentaram pouca variação estrutural (*e.g.* *C. elegans* e *H. sapiens*, RMSD=1.120Å), e assim, sugerimos que não há diferenças significativas entre as estruturas do domínio quinase destes grupos (Maiorov & Crippen, 1995).

Além, as alterações de aminoácidos também não interferiram significativamente na estrutura das proteínas codificadas por *daf-2* em *W. mirabilis* e *S. lepidophylla* (figura 17). É expressivo que as estruturas terciárias do domínio quinase sejam mantidas mesmo com todas as substituições de aminoácidos. A literatura apresenta diversos relatos da interferência de um único aminoácido nas características gerais da proteína. Por exemplo, Glaser *et al* (2005), mostrou que a substituição de um único aminoácido na glicoproteína hemaglutinina altera o alvo de preferência pelo receptor. Al-Shuhaib (2019) identificou três aminoácidos distintos que quando alterados, apresentavam consequências na estrutura, função e estabilidade da proteína leptina, resultando em um efeito deletério. Ng & Henikoff (2006) também pontuam como a alteração de um único nucleotídeo pode afetar a função das proteínas e impactar na saúde do organismo, sendo de amplo

conhecimento que alterações como as apresentadas aqui podem interferir consideravelmente na conformação, função, e dinâmica das proteínas.

Embora a literatura careça de investigações nesse sentido e que aborde o contexto da animação suspensa, pontuamos a importância evolutiva dessa diversificação. Os resíduos divergentes podem ter funcionalidades relacionadas a outros aspectos da anidrobiose, pois ao longo desse estado adaptações são necessárias para que as proteínas resistam a ausência de água, alteração de pH, acúmulo de dissacarídeos e demais modificações intrínsecas ao estado (Tunnacliffe & Lapinski, 2003).

Em suma, o domínio quinase da proteína codificada por *daf-2* apresenta alto grau de semelhança estrutural entre os organismos do reino animal, seja comparando-os entre os grupos anidrobiontes e não-anidrobiontes, ou entre si separadamente, corroborando com a literatura. A proteína de *daf-2* prevista apresenta, em média, 34% de identidade a outros receptores relacionado a insulina (e.g. IGF-I e receptor de insulina humana) e mostra-se igualmente distante destes, de modo que *daf-2* é provavelmente o homólogo ancestral desses receptores duplicados e divergentes (Kimura *et al.*, 1997). Considerando os resultados obtidos, e o alto grau de conservação estrutural entre os organismos anidrobiontes e não-anidrobiontes, reflexo da importância desta ao longo do processo evolutivo, é sugestivo que a função fisiológica deste domínio seja também semelhante entre as espécies e em contexto celular.

6.2 Exposição em câmara anóxica

Considerando nossa hipótese de que a anidrobiose é um estado ametabólico, avaliamos a viabilidade do nematoide anidrobionte *P. superbus* após exposição em ambiente anóxico (câmara de N₂), ao longo de um, três, e seis meses.

O N₂ é considerado um gás de baixa reatividade, ou seja, que não desempenha um papel ativo em trocas gasosas. Sua inércia é resultado da ligação tripla (duas π e uma δ) entre os átomos de nitrogênio, necessárias para sua estabilidade na camada de valência. Como efeito, o gás nitrogênio é amplamente utilizado para simulações de anóxia, por deslocar o ar e manter o interior de recipientes livre de oxigênio (Isac-García *et al.*, 2015).

Os animais utilizam 90% do oxigênio na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial para a fosforilação oxidativa e a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (Saraste, 1999; Lu *et al.*, 1999). Uma vez que o metabolismo aeróbico é crítico para grande parte dos organismos, modificações para manter os níveis de oxigênio celular em

condições hipóxicas ou mesmo anóxicas foram selecionadas ao longo da evolução (Childress e Seibel, 1998), como aumento das taxas de fluxo glicolítico, redução da taxa metabólica e aumento da eficiência de remoção de oxigênio ambiental (Johansson *et al.*, 1995; Childress e Seibel, 1998). Entretanto, mesmo com esses mecanismos, ambientes com concentração de oxigênio muito limitada tendem a ser fatais para a vasta maioria dos seres vivos.

Estudos realizados com o organismo modelo *Drosophila melanogaster* mostrou que exposição a anóxia em N₂ por mais de 1h causava letalidade das moscas (Xia, Y. *et al.*, 2018). Outro estudo mostrou que a sobrevivência de camundongos expostos por cinco minutos a anóxia em N₂ (O₂ < 5 mm Hg) foi de apenas 5% entre os animais testados (Holowach-Thurston *et al.*, 1974). Já estudos focados na sobrevivência dos nematoides *Daptonema setosum*, *Daptonema tenuispiculum* e *Chromadora macrolaima*, espécies de habitat oxigenado, demonstrou a grande sensibilidade destes à depleção de oxigênio, pois ao final de 14 dias de imersão aquática subóxica (3% de O₂) e anóxica (0 µmol/l de O₂), os nematoides desapareceram completamente (Steyaert, M., *et al.*, 2007).

Mostramos anteriormente que quando expostos a atmosfera natural e hidratados o percentual de sobrevivência de *P. superbus* é consideravelmente baixo (31%) (Contiliani, *et al.*, 2020). A explicação para a alta mortalidade nessa condição é a ausência de alimento, de modo que a demanda de energia não pode ser suprimida e os danos causados se acumulam, resultando na morte do organismo. Por outro lado, mostramos também que os grupos expostos a condições de atmosfera natural (*i.e.*, C1, C3, C6) e anóxica (*i.e.*, N1, N3, N6), quando em animação suspensa, apresentam considerável percentual de sobrevivência ao estresse de anóxia e equivalência entre si (figura 18).

A sobrevivência de espécies holo-anidrobiontes por longos períodos é esperada, pois estudos mostraram que em animação suspensa e organismos anidrobiontes são bioestáveis por anos e até mesmo décadas (Shatilovich, *et al.*, 2018; Steiner, G., e Albin, F. E., 1946). No entanto, identificamos um declínio gradual na viabilidade dos nematoides em ambos os grupos expostos, como mostra o gráfico da figura 18. Esse mesmo padrão de decaimento foi descrito por Orstan (1998) ao manter rotíferos bdeloides expostos em câmara de argônio ([O₂] < 0,0004%). Semelhantemente, um estudo avaliou a sobrevivência de rotíferos bdeloides, tardígrados e nematoides presentes em líquen armazenados secos em temperatura e umidade ambiente, ao desafio de dessecação. Após um mês em anidrobiose 100% dos animais haviam sobrevivido. Após um ano notou-se que uma proporção menor de organismos sobreviveu ao desafio: cerca de 79% dos

rotíferos bdeloides, 56% dos tardígrados e 39% dos nematoides e após esse período a maioria dos organismos estavam mortos (<0,1% sobreviveram) (Fontaneto *et al.*, 2012).

O mesmo estudo aponta que a taxa de sobrevivência dos organismos diverge entre os táxons e de acordo com a forma de conservação, o que também foi demonstrado em outras pesquisas (*e.g.*, Cáceres, C. E., 1997). Dessa forma, interpretamos que a taxa de sobrevivência dos organismos varia de acordo com os grupos filogenéticos e está atrelada as condições de armazenamento (Fontaneto *et al.*, 2012).

De fato, além da taxa de sobrevivência ter diminuído, o período de viabilidade em anidrobiose é curto em relação a outras classes filogenéticas, como *Branchiopoda* que permaneceu viável por ± 160 anos e *Maxillopoda* ± 400 anos (Cáceres, C. E., 1997). No entanto, considerando o período exposto, é muito significativo que o nematoide *P. superbis* se mantenha viável quando comparado com o tempo em que a mesma espécie sobreviveria em condições de metabolismo totalmente ativo (~ 15 dias em 20°C), e conforme demonstrado, mesmo após seis meses de exposição em N₂ e atmosfera natural, a sobrevivência entre os nematoides era equivalente ($p > 0.05$). Além disso, quando comparamos nossos resultados do organismo *P. superbis* em anidrobiose e exposto a anóxia, com os dados obtidos em estudo anterior, em que *P. superbis* foi mantido hidratado em condições semelhantes (ambiente de matriz de Gálio, anóxico) notamos uma sobrevivência por um período 25,7 vezes maior (anexo A) (Contiliani *et al.*, 2020), enfatizando o papel de preservação da anidrobiose.

Uma hipótese interessante para justificar o decaimento da viabilidade ao longo do tempo seria a possível retomada de condições ambientais, especialmente da umidade no interior da câmara. A retomada da umidade na câmara poderia resultar na saída do organismo do estado de animação suspensa, e assim, o regresso ao seu estado natural. Nesse sentido, apesar das medidas tomadas para que isso não ocorresse, ao longo do transporte ou retirada das amostras da câmara, a umidade pode ter sido retomada em algum grau. Orstan (1998) mostrou que determinadas reações químicas de umidade controlada e que utilizam oxigênio podem estar envolvidas na morte de organismos anidrobiontes. A exemplo, dano por oxidação em organelas e componentes celulares diversos foram pontuados como responsáveis pela diminuição da viabilidade de procariotos e eucariotos secos (Zentner, 1966; Potts, 1994; Crowe & Madin, 1974).

Entretanto, caso a anóxia e condições ambientais da câmara tenham sido plenamente preservadas, pontuamos que algum outro curioso mecanismo, não

dependente de oxigênio e por enquanto desconhecido, esteja envolvido na morte gradual dos organismos expostos, somando ao processo natural de decaimento.

De toda forma, demonstramos nesse trabalho que a anidrobiose e sua resposta ao estresse fisiológico da dessecação corroboram para manter viável o organismo modelo por períodos consideráveis de um, três e seis meses, e com significativa taxa de viabilidade, e deixamos nossa contribuição para a discussão do modelo de ametabolismo (*i.e.*, ausência de atividades dependentes de oxigênio) da animação suspensa.

7. Conclusões

7. Conclusões

No presente trabalho, buscamos caracterizar o estado anidrobiótico em cenário anóxico, e identificar possíveis divergências entre a proteína do gene *daf-2* de organismos anidrobiontes e organismos não-anidrobiontes.

Nossos estudos *in silico* mostraram que determinadas adaptações físico-químicas são sugestivas do cenário de animação suspensa, como a predominância de uma proteína básica. Além, considerando a estrutura tridimensional do domínio quinase da proteína DAF-2, amplamente conservada entre as espécies, subentende-se que a atuação deste também seja fisiologicamente semelhante. Finalmente, concluímos que o organismo modelo *P. superbus* sobrevive por um, três, e seis meses quando em anidrobiose e na ausência de oxigênio.

Tais achados contribuem para melhor caracterização da anidrobiose e discussão do seu estado ametabólico, o que é importante por implicar em uma das questões centrais da biologia: a definição de vida – trazida por muitos autores como um sistema metabolicamente ativo.

8. Sugestões

Sugestões

Para estudos futuros que envolvam o estado de animação suspensa e DAF-2, e a busca por assinaturas da anidrobiose, é sugerido:

- O nocaute (*knockout*) ou silenciamento (*knockdown*) do gene *daf-2* de outros organismos anidrobiontes, além de *C. elegans*, e a análise de seu efeito fisiológico em condições de animação suspensa;
- Avaliações de dinâmica molecular de proteínas importantes para anidrobiose e em contexto de animação suspensa e investigação de aminoácidos que apresentem relevância nesse contexto.

Tais investigações lançarão luz a respeito da atuação de DAF-2 em cenário anidrobiótico, bem como a compreensão de sua atuação em outros organismos e as possíveis assinaturas da anidrobiose.

9. Bibliografía

Bibliografia

Alcock, R., Cottingham, M. G., Rollier, C. S., Furze, J., De Costa, S. D., Hanlon, M., & Hill, A. V. (2010). Long-term thermostabilization of live poxviral and adenoviral vaccine vectors at suprphysiological temperatures in carbohydrate glass. *Science translational medicine*, 2(19), 19ra12-19ra12.

Al-Shuhaib, M. B. S. (2019). D76V, L161R, and C117S are the most pathogenic amino acid substitutions with several dangerous consequences on leptin structure, function, and stability.

Banks, A. (1990). Nitrogen. *Journal of Chemical Education*, 67(3), 215.

Barrett, J. (1982). 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(1203), 159-177.

Beltrán-Pardo, E., Jönsson, K. I., Wojcik, A., Haghdoost, S., Harms-Ringdahl, M., Bermúdez-Cruz, R. M., & Villegas, J. E. B. (2013). Effects of ionizing radiation on embryos of the tardigrade *Milnesium cf. tardigradum* at different stages of development. *PLoS one*, 8(9), e72098.

Cáceres, C. E. (1997). Dormancy in invertebrates. *Invertebrate biology*, 371-383.

Childress, J. J., & Seibel, B. A. (1998). Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *Journal of experimental biology*, 201(8), 1223-1232.

Clamp, M., Cuff, J., & Barton, G. (1998). JalView—analysis and manipulation of multiple sequence alignments. *EMBnet News*, 5(4), 16-21.

Clegg, J. S. (1974). Biochemical adaptations associated with the embryonic dormancy of *Artemiasalina*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 481-490.

Clegg, J. S. (1978). Hydration-dependent metabolic transitions and the state of cellular water in *Artemia* cysts. *Dry biological systems*, 117-153.

Clegg, J. S. (2001). Cryptobiosis—a peculiar state of biological organization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128(4), 613-624.

Clegg, J. S., Seitz, P., Seitz, W., & Hazlewood, C. F. (1982). Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis. *Cryobiology*, 19(3), 306-316.

Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science*, 2(9), 1511-1519.

Contiliani, D. F., de Araújo Ribeiro, Y., de Moraes, V. N., & Pereira, T. C. (2020). *Panagrolaimus superbus* tolerates hypoxia within Gallium metal cage: implications for the understanding of the phenomenon of anhydrobiosis. *Journal of nematology*, 52, 1.

Crowe, J. H., & Madin, K. A. (1974). Anhydrobiosis in tardigrades and nematodes. *Transactions of the American Microscopical Society*, 513-524.

- Crowe, J. H., & Madin, K. A. (1974). Anhydrobiosis in tardigrades and nematodes. *Transactions of the american microscopical society*, 513-524.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., & Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54(1), 579-599.
- de Castro, A. G., & Tunnacliffe, A. (2000). Intracellular trehalose improves osmotolerance but not desiccation tolerance in mammalian cells. *FEBS letters*, 487(2), 199-202.
- Eisenberg, D., Lüthy, R., & Bowie, J. U. (1997). [20] VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in enzymology*, 277, 396-404.
- Erkut, C., Penkov, S., Khesbak, H., Vorkel, D., Verbavatz, J. M., Fahmy, K., & Kurzchalia, T. V. (2011). Trehalose renders the *dauer* larva of *Caenorhabditis elegans* resistant to extreme desiccation. *Current Biology*, 21(15), 1331-1336.
- Evangelista, C. C. S., Guidelli, G. V., Borges, G., Araujo, T. F., Souza, T. A. J. D., Neves, U. P. D. C., ... & Pereira, T. C. (2017). Multiple genes contribute to anhydrobiosis (tolerance to extreme desiccation) in the nematode *Panagrolaimus superbus*. *Genetics and molecular biology*, 40(4), 790-802.
- Ewbank, J. (2006). Signaling in the immune response. *WormBook: the online review of C. elegans biology*, 1-12.
- Farrant, J. M., & Moore, J. P. (2011). Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 340-345.
- Fontaneto, D., Bunnefeld, N., & Westberg, M. (2012). Long-term survival of microscopic animals under desiccation is not so long. *Astrobiology*, 12(9), 863-869.
- França, M. B., Panek, A. D., & Eleutherio, E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 621-631.
- Glaser, L., Stevens, J., Zamarin, D., Wilson, I. A., García-Sastre, A., Tumpey, T. M., ... & Palese, P. (2005). A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *Journal of virology*, 79(17), 11533-11536.
- Gottlieb, S., & Ruvkun, G. (1994). *daf-2*, *daf-16* and *daf-23*: genetically interacting genes controlling Dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 137(1), 107-120.
- Hengherr, S., Worland, M. R., Reuner, A., Brümmer, F., & Schill, R. O. (2009). High-temperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(6), 749-755.
- Heo, L., Park, H., & Seok, C. (2013). GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic acids research*, 41(W1), W384-W388.
- Holowach-Thurston, J., Hauhart, R. E., & Jones, E. M. (1974). Anoxia in mice: reduced glucose in brain with normal or elevated glucose in plasma and increased survival after glucose treatment. *Pediatric research*, 8(4), 238-243.

- Horikawa, D. D., Iwata, K. I., Kawai, K., Koseki, S., Okuda, T., & Yamamoto, K. (2009). High hydrostatic pressure tolerance of four different anhydrobiotic animal species. *Zoological science*, 26(3), 238-242.
- Horikawa, D. D., Sakashita, T., Katagiri, C., Watanabe, M., Kikawada, T., Nakahara, Y., & Kobayashi, Y. (2006). Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *International journal of radiation biology*, 82(12), 843-848
- Isac-García, J., Dobado, J. A., Calvo-Flores, F. G., & Martínez-García, H. (2015). *Experimental Organic Chemistry: Laboratory Manual*. Academic Press.
- Johansson, D., Nilsson, G. E., & Törnblom, E. R. I. K. (1995). Effects of anoxia on energy metabolism in crucian carp brain slices studied with microcalorimetry. *Journal of Experimental Biology*, 198(3), 853-859.
- Jönsson, K. I. (2005). The evolution of life histories in holo-anhydrobiotic animals: a first approach. *Integrative and comparative biology*, 45(5), 764-770.
- Jönsson, K. I., Rabbow, E., Schill, R. O., Harms-Ringdahl, M., & Rettberg, P. (2008). Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current biology*, 18(17), R729-R731.
- Keilin, D. (1959). The Leeuwenhoek lecture: the problem of anabiosis or latent life: history and current concept. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, *Biological Sciences*, 150(939), 149-191.
- Kikuta, S., Watanabe, S. J., Sato, R., Gusev, O., Nesmelov, A., Sogame, Y., ... & Kikawada, T. (2017). Towards water-free biobanks: long-term dry-preservation at room temperature of desiccation-sensitive enzyme luciferase in air-dried insect cells. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., & Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277(5328), 942-946.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26(2), 283-291.
- Li, D., & He, X. (2009). Desiccation induced structural alterations in a 66-amino acid fragment of an anhydrobiotic nematode late embryogenesis abundant (LEA) protein. *Biomacromolecules*, 10(6), 1469-1477.
- Lu, C. Y., Lee, H. C., Fahn, H. J., & Wei, Y. H. (1999). Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 423(1), 11-21.
- Maiorov, V. N., & Crippen, G. M. (1995). Size-independent comparison of protein three-dimensional structures. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 22(3), 273-283.

- Mattimore, V., & Battista, J. R. (1996). Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of bacteriology*, 178(3), 633-637.
- Müller, H., Achilles-Day, U. E., & Day, J. G. (2010). Tolerance of the resting cysts of Colpodainflata (Ciliophora, Colpodea) and Meserescolissi (Ciliophora, Spirotrichea) to desiccation and freezing. *European journal of protistology*, 46(2), 133-142.
- Ng, P. C., & Henikoff, S. (2006). Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 7, 61-80.
- Oliver, M. J., Tuba, Z., & Mishler, B. D. (2000). The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology*, 151(1), 85-100.
- Ooms, J. J., Leon-Kloosterziel, K. M., Bartels, D., Koornneef, M., & Karssen, C. M. (1993). Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants). *Plant physiology*, 102(4), 1185-1191.
- Örstan, A. (1998). Factors affecting long-term survival of dry bdelloid rotifers: a preliminary study. In *Rotifera VIII: A Comparative Approach* (pp. 327-331). Springer, Dordrecht.
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172), 666-666.
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. storage. Soil Biol. Biochem*, 23, 313-322.
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological reviews*, 58(4), 755-805.
- Reardon, W., Chakrabortee, S., Pereira, T. C., Tyson, T., Banton, M. C., Dolan, K. M., ... & Tunnacliffe, A. (2010). Expression profiling and cross-species RNA interference (RNAi) of desiccation-induced transcripts in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *BMC molecular biology*, 11(1), 1-18.
- Rikke, B. A., Murakami, S., & Johnson, T. E. (2000). Paralogy and orthology of tyrosine kinases that can extend the life span of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology and evolution*, 17(5), 671-683.
- Sakurai, M., Furuki, T., Akao, K. I., Tanaka, D., Nakahara, Y., Kikawada, T., ... & Okuda, T. (2008). Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid,
- Saragusty, J., & Loi, P. (2019). Exploring dry storage as an alternative biobanking strategy inspired by Nature. *Theriogenology*, 126, 17-27.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*, 283(5407), 1488-1493.
- Shamrock, V. J., & Lindsey, G. G. (2008). A compensatory increase in trehalose synthesis in response to desiccation stress in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking the heat shock protein Hsp12p. *Canadian journal of microbiology*, 54(7), 559-568.

Shannon, A. J., Browne, J. A., Boyd, J., Fitzpatrick, D. A., & Burnell, A. M. (2005). The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics of species and strains of *Panagrolaimus* (Nematoda, Panagrolaimidae). *Journal of experimental biology*, 208(12), 2433-2445.

Shatilovich, A. V., Tchesunov, A. V., Neretina, T. V., Grabarnik, I. P., Gubin, S. V., Vishnivetskaya, T. A., ... & Rivkina, E. M. (2018, May). Viable nematodes from late Pleistocene permafrost of the Kolyma river lowland. In *Doklady Biological Sciences* (Vol. 480, No. 1, pp. 100-102). Pleiades Publishing.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1), 539.

Spruyt, M., & F. Buquicchio, (1994). Gene runner version 3.05.

Steiner, G., & Albin, F. E. (1946). Resuscitation of the nematode *Tylenchus polyhyphus*, n. sp., after almost 39 years' dormancy. *Journal of the washington academy of sciences*, 36(3), 97-99.

Steyaert, M., Moodley, L., Nadong, T., Moens, T., Soetaert, K., & Vincx, M. (2007). Responses of intertidal nematodes to short-term anoxic events. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 345(2), 175-184.

Steyaert, M., Moodley, L., Nadong, T., Moens, T., Soetaert, K., & Vincx, M. (2007). Responses of intertidal nematodes to short-term anoxic events. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 345(2), 175-184.

Sun, W. Q., & Leopold, A. C. (1997). Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117(3), 327-333.

Tunnacliffe, A., & Lapinski, J. (2003). Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 358(1438), 1755-1771

Tyson, T., Zamora, G. O. M., Wong, S., Skelton, M., Daly, B., Jones, J. T., ... & Burnell, A. M. (2012). A molecular analysis of desiccation tolerance mechanisms in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus* using expressed sequenced tags. *BMC research notes*, 5(1), 68.

Watanabe, M., Sakashita, T., Fujita, A., Kikawada, T., Nakahara, Y., Hamada, N., ... & Okuda, T. (2006). Estimation of radiation tolerance to high LET heavy ions in an anhydrobiotic insect, *Polypedilum vanderplanki*. *International journal of radiation biology*, 82(12), 835-842.

Weeks, M. E. (1934). Daniel Rutherford and the discovery of nitrogen. *Journal of Chemical Education*, 11(2), 101.

Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W407-W410.

Wilson, C. G., & Sherman, P. W. (2010). Anciently asexual bdelloid rotifers escape lethal fungal parasites by drying up and blowing away. *Science*, 327(5965), 574-576.

Womersley, C., & Smith, L. (1981). Anhydrobiosis in nematodes—I. The role of glycerol myo-inositol and trehalose during desiccation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 70(3), 579-586.

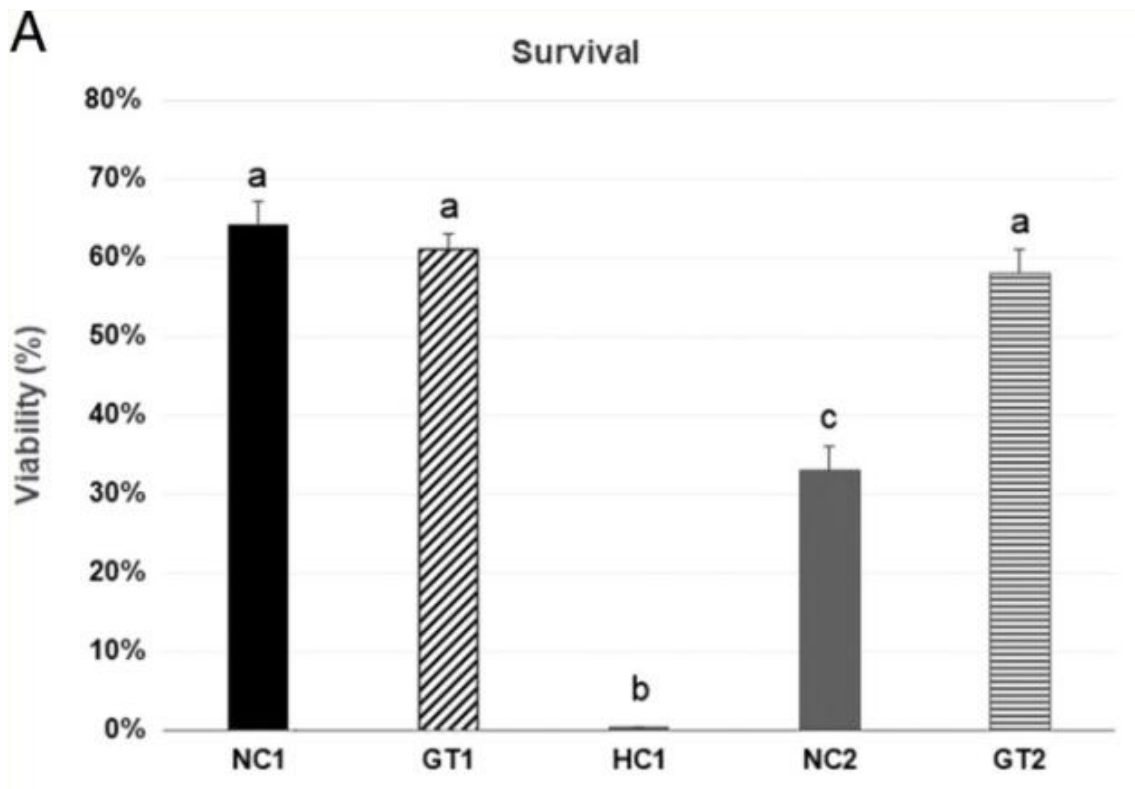
Xia, Y., Xu, W., Meng, S., Lim, N. K., Wang, W., & Huang, F. D. (2018). An efficient and reliable assay for investigating the effects of hypoxia/anoxia on *Drosophila*. *Neuroscience bulletin*, 34(2), 397-402.

Zentner, R. J. (1966). Physical and chemical stresses of aerosolization. *Bacteriological reviews*, 30(3), 551.

Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*, 9(1), 1-8.

10. Anexos

Anexo A



Legenda: Viabilidade de *P. superbus* em matriz de Gálio. Controle negativo 1 (NC1) - membranas com vermes dessecados, sem Gálio, a 10% UR; Tratamento com Gálio 1 (GT1) - membranas com vermes dessecados recobertos por Gálio em 10% UR; controle hidratado (HC1) - membranas com vermes hidratados recobertos por Gálio em 100% UR; controle negativo (NC2) - membranas com vermes dessecados, sem Gálio, a 99% UR; Tratamento 2 com Gálio (GT2) - membranas com vermes dessecados cobertos por Gálio em 99% UR. Letras diferentes (aeb) significam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

11. Apêndices

Apêndice A: Aminoácidos conservados em não-anidrobiontes (acima) e configuração respectiva em anidrobiontes (abaixo). Os aminoácidos com contornos indicam variações em relação aos aminoácidos conservados em não-anidrobiontes. As plantas de interesse, *Welwitschia mirabilis* e *Selaginella lepidophylla*, estão em destaque (rosado). Note a grande variação de aminoácidos em relação aos demais organismos.

Aminoácidos conservados em não-anidrobiontes																
Domínio quinase																
1192 - 1475																
Organismos	1282	1328	1339	1341	1346	1356	1359	1360	1361	1387	1400	1403	1405	1410	1464	
<i>Caenorhabditis elegans</i> (referência)	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Drosophila melanogaster</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Mus musculus</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Homo sapiens</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Oryza sativa</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Hordeum vulgare</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Nicotiana tabacum</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Zea mays</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Aspergillus nidulans</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Neurospora crassa</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Artemia franciscana</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Panagrolaimus superbus</i>	E	G	H	D	N	N	D	F	G	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Webtschia mirabilis</i>	D	A	Y	D	N	Q	D	F	D	P	D	A	G	E	-	
<i>Selaginella lepidophylla</i>	D	A	Y	D	N	L	D	F	D	P	D	A	G	E	-	
<i>Physcomitrella patens</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Syntrichia caninervis</i>	E	V	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	I	P	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	
<i>Schizophyllum commune</i>	E	G	H	D	N	K	D	F	G	P	D	S	G	E	P	