

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

Expressão e estrutura da proteína ligante de lipídio 3 (*lbp-3*), e o efeito da suplementação de ácidos graxos na tolerância a dessecação do nematoide *Panagrolaimus superbus*.

Vitor Nolasco de Moraes

RIBEIRÃO PRETO – SP

2023

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

Vitor Nolasco de Moraes

Expressão e estrutura da proteína ligante de lipídio 3 (*lbp-3*), e o efeito da suplementação de ácidos graxos na tolerância a dessecação do nematoide *Panagrolaimus superbus*.

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

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

RIBEIRÃO PRETO – SP

2023

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

Moraes, Vitor Nolasco

Expressão e estrutura da proteína ligante de lipídio 3 (*lbp-3*), e o efeito da suplementação de ácidos graxos na tolerância a dessecação do nematoide *Panagrolaimus superbus*.

123f.:il.; 30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética

Orientador: Pereira, Tiago Campos

1. Ácidos graxos. 2. Anidrobiose. 3. Alphafold. 4. LBPs. 5. Modelagem estrutural

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vitor Nolasco de Moraes

Expressão e estrutura da proteína ligante de lipídio 3 (*lbp-3*), e o efeito da suplementação de ácidos graxos na tolerância a dessecação do nematoide *Panagrolaimus superbus*.

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

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Lembre-se de olhar para o alto, para as estrelas, e não para baixo, para os seus pés”.

(Stephen Hawking)

Dedico este trabalho especialmente àqueles que não mediram esforços para realização dos meus sonhos, sempre agindo com amor. À minha mãe, Neiva e ao meu pai, Everaldo, pela vida dedicada ao meu desenvolvimento e formação como homem; vocês são meu farol, minha inspiração, e meu espelho.

**Toda despedida é dor. Tão doce todavia, que eu te diria boa noite até que
amanhecesse o dia.**

(William Shakespeare)

Agradecimentos

Agradeço a minha família por todo o apoio e suporte em todos os momentos, principalmente nos momentos difíceis. Vocês me proporcionaram o que de mais precioso existe, o amor.

Agradeço a todos os professores com os quais tive o privilégio de aprender ao longo da minha formação. Todos os ensinamentos de vocês me permitiram chegar até aqui. Em especial ao prof. Dr. Carlos Roberto Bueno Jr por ter me dado minha primeira oportunidade em um projeto de pesquisa, por sempre ter acreditado em mim, incentivado, me ensinado como ser um pesquisador, e por ter sido muito mais que um orientador, um amigo.

Agradeço a todas as pessoas que conheci ao longo da minha trajetória, todos deixaram um pouco de si em mim e me proporcionaram experiências e momentos ímpares que guardarei para sempre comigo.

Agradeço aos melhores amigos que eu poderia ter tido a sorte de compartilhar a vida - Felipe, Caio, Lais, Nicholas, Mickael, Vinicius, Renan, Eduardo, Paulo, Guilherme, Sthepano, Arthur, Homero, Daniel, Samara, Dalton, Tiago, João, Larissa, Karine, Cláudio, Danyel e Yasmin. Vocês tornaram cada passo dessa caminhada mais leve e me proporcionam os momentos mais especiais que alguém poderia experimentar. Espero conseguir retribuir pelo menos um pouco de tudo o que fizeram por mim. Sem vocês a vida não teria tido a mesma graça até aqui.

Agradeço ao professor Tiago Campos Pereira por ter acreditado no meu potencial e me orientado, e me ensinado a arte da docência. Seus ensinamentos serão de grande valia para minha jornada como futuro educador.

Agradeço a todos os laboratórios que cederam espaço para realização de experimentos, compartilharam informações e ensinamentos ao longo da minha trajetória acadêmica. Em especial aos laboratórios do professor Dr. Carlos Roberto Bueno Jr, Dr. Thiago Aparecido da Silva e professor Dr. João Muniz por permitirem a condução de experimentos relacionados ao presente projeto.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP).

Agradeço aos membros da banca pela disposição do tempo e orientação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de doutorado concedida durante este período.

E por fim, também, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

MORAES, V. N. Expressão e estrutura da proteína ligante de lipídio 3 (*lbp-3*), e o efeito da suplementação de ácidos graxos na tolerância a dessecação do nematoide *Panagrolaimus superbus*. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

Anidrobiose é um estado de animação suspensa em que alguns organismos entram frente ao estresse hídrico, tendo sua atividade metabólica retomada quando reidratados. Lipídios possuem importantes funções energéticas, na sinalização, e composição de membranas em condições normais e durante dessecação. Pouco se sabe sobre a relação das moléculas estruturais dos lipídios, *i.e.*, os ácidos graxos, e a anidrobiose. O presente trabalho focou em avaliar o efeito da suplementação com ácido mirístico e ácido linoleico na anidrobiose do nematoide *P. superbus*, a expressão de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos, como também, caracterizar estruturalmente a proteína LBP-3. Para o desenvolvimento do estudo, os vermes foram cultivados em placas suplementadas com 0,8 mM e 4 mM de ácido mirístico e ácido linoleico durante três e dez dias, e então foram avaliados a viabilidade e crescimento populacional antes e após a indução da anidrobiose. A expressão gênica foi avaliada por RT-qPCR. A estrutura proteica de LBP-3 foi modelada utilizando o programa AlphaFold e analisada para a busca por diferenças estruturais com proteínas de organismos não anidrobiontes. Foi observado que o ácido linoleico prejudica a tolerância do *P. superbus* à dessecação extrema, e leva ao menor crescimento populacional. Sob estresse da dessecação, *fat-5* e *nhr-49* apresentaram redução significativa na expressão gênica, enquanto *lbp-3* aumentou significativamente. Em relação às análises estruturais, foi observado que LBP-3 apresenta uma sequência sinal de exportação nuclear composta pelos 21 primeiros amino ácidos na porção N-terminal, diferentes orientações nas α -hélices e uma composição de amino ácidos hidrofílicos na base de sua estrutura de barril- β . Os resultados sugerem que a composição de ácidos graxos no metabolismo é importante para a tolerância a anidrobiose, e que *lbp-3* possivelmente é um novo gene relacionado a anidrobiose.

Palavras chave: 1. Ácidos graxos. 2. Anidrobiose. 3. Alphafold. 4. LBPs. 5. Modelagem estrutural

ABSTRACT

MORAES, V. N. Expression and structure of the lipid binding protein 3, and the effect fatty acids supplementation on *Panagrolaimus superbus* anhydrobiosis. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

Anhydrobiosis is a stable state of suspended animation which some organisms can enter when facing drought conditions, and it can be reversed upon rehydration. Lipids present important functions as an energy source, as signaling molecules and in membrane composition in normal and desiccating conditions. Despite that, little is known about the relationship between fatty acids and anhydrobiosis. Thus, this study aimed to analyze the effect of myristic acid and linoleic acid on *P. superbus* anhydrobiosis, as well as, fatty acid metabolism-related genes expression, and structurally characterize the LBP-3 protein. For the study development, the worms were placed in growth plates supplied with 0.8 mM and 4.0 mM of myristic acid and linoleic acid for three and ten days, and then, the survival and population growth were evaluated prior to and after desiccation. Gene expression was evaluated by RT-qPCR. The protein structure of LBP-3 was modeled with the AlphaFold and analyzed for differences in comparison with non-anhydrobiotic proteins. The results obtained demonstrated that the linoleic acid impairs *P. superbus* anhydrobiosis, and leads to small population growth. Under desiccation conditions, *fat-5* and *nhr-49* significantly decreased their expression, while *lbp-3* significantly increased their expression. Regarding the structural analysis, LBP-3 possesses an extracellular exportation signal composed of its first 21 amino acids at the N-terminal portion, presents differently oriented α -helices and a hydrophilic amino acid composition at the bottom of the β -barrel structure. The results suggest that composition of fatty acid available in metabolism is important for anhydrobiosis tolerance, and *lbp-3* possibly is a new anhydrobiosis-related gene.

Keywords: 1. Fatty acids. 2. Anhydrobiosis. 3. AlphaFold. 4. LBPs. 5. Structural modeling.

LISTA DE ABREVIações

g/g	Grama / grama (massa por massa)
L1	Primeiro estágio de desenvolvimento larval
L2	Segundo estágio de desenvolvimento larval
L3	Terceiro estágio de desenvolvimento larval
L4	Quarto estágio de desenvolvimento larval
h	Hora
°C	Graus Celsius
FABPs	Fatty acid binding proteins
Mya	Milhões de anos atrás
mL	Mililitro
µL	Microlitro
Min	Minutos
NGM	Nematode growth medium
M9	Solução tampão isosmótica
µM	Micrômetro
UR	Umidade relativa
g	Força g, aceleração correspondente a 9,8 m/s²
RNA	Ácido ribonucleico
F	Forward
R	Reverse

cDNA	DNA complementar
RT	Transcrição reversa
qPCR	PCR em tempo real
ng	Nanograma
w/v	weight/volume
EST	Expressed sequence tag
PDB	Protein data bank
mM	Milimolar
Kcal	Quilocaloria
Tyr (Y)	Tirosina
Arg (R)	Arginina
GLN (Q)	Glutamina
MET (M)	Metionina
α	alfa
Å	Angström
SLN	Sinal de localização nuclear
Lys (K)	Lisina
Cys (C)	Cisteína
Δ	Delta
Leu (L)	Leucina
HSL	Hormônio sensível lipase

Phe (F)

Fenilalanina

SEN

Sinal de exportação nuclear

His (H)

Histidina

β

Beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anidrobiose	21
Figura 2. Manutenção da estrutura de moléculas durante a entrada em anidrobiose	22
Figura 3. Representantes anidrobiontes de diferentes reinos.	23
Figura 4. Organismos do filo Nematoda.	25
Figura 5. Estágios de desenvolvimento do <i>P. superbus</i> com base no tempo de eclosão	26
Figura 6. Função das proteínas FABPs.	28
Figura 7. Estrutura das moléculas de ácidos graxos.	32
Figura 8. Equação para cálculo do RMSD	38
Figura 9. Efeito da suplementação com ácidos graxos na tolerância a anidrobiose do <i>P. superbus</i>	41
Figura 10. Efeito da suplementação com ácido linoleico no crescimento populacional do <i>P. superbus</i>	43
Figura 11. Expressão relativa dos genes <i>fat-5</i> , <i>lbp-3</i> e <i>nhr-49</i> em condição hidratada e em anidrobiose.....	45
Figura 12. Interação de LBP-3 com ácidos graxos.	47
Figura 13. Alinhamento e conservação por identidade das sequências primárias das FABPs de organismos não anidrobiontes e anidrobiontes.....	53
Figura 14. Sobreposição das estruturas.....	55
Figura 15. Caracterização da região das α -hélices em LBP-3.....	57

Figura 16. Predição da localização de LBP-3.	59
Figura 17. FABPs hidropaticidade.	61
Figura 18. Mecanismo proposto.	72
Figura 19. Crescimento populacional em <i>P. superbus</i>	86
Figura 20. Gel de verificação de dímeros.	90
Figura 21. Gráficos de amplificação e de temperatura de melting das amostras hidratadas e dessecadas.	91
Figura 22. Eletroforese dos produtos da transcrição <i>in vitro</i> realizadas em momentos diferentes.	94
Figura 23. Expressão gênica de <i>lbp-3</i> após silenciamento gênico.	95
Figura 24. Cladograma das proteínas FABPs	96
Figura 25. Razão entre os aminoácidos mais conservados em um grupo em relação ao outro.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i>	34
Tabela 2. Termos utilizados para levantamento bibliográfico.	37
Tabela 3. Descrição das sequências obtidas para os organismos não anidrobiontes.....	49
Tabela 4. Descrição das sequências obtidas para os organismos anidrobiontes.	50
Tabela 5. Crescimento populacional após dessecação.	87
Tabela 6. Retorno da busca no pdb utilizando LBP-3 de <i>C. elegans</i> como isca.	108
Tabela 7. Artigos descrevendo aminoácidos com função estrutural em FABPs.	109
Tabela 8. Descrição da função de aminoácidos divergentes entre os grupos.	110
Tabela 9. Predição de ponte dissulfeto em LBP-3 de <i>P. superbus</i>	111

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.1 A anidrobiose	20
1.2 Modelo de Estudo – <i>Panagrolaimus superbus</i>	24
1.3 As Proteínas Ligantes de Ácido Graxo (FABPs).....	27
2. Objetivos	30
2.1 Objetivos gerais	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. Materiais e Métodos	31
3.1. Manutenção do <i>P. superbus</i>	31
3.2. Manipulação dos Nematoides para Análises	31
3.3. Suplementação com Ácidos Graxos	31
3.4. Dessecação.....	32
3.5. Extração de RNA	33
3.6. Desenho dos <i>primers</i>	33
3.7. Análise do perfil de expressão gênica	34
3.8. Ensaio de viabilidade.....	35
3.9. Análises in silico	35
3.9.1. Obtenção de sequências primárias de FABPs.....	35
3.9.2. Alinhamento Múltiplo.....	36

3.9.3 Análise dos Aminoácidos Divergentes Entre os Grupos	36
3.9.4. Identificação de potenciais aminoácidos com função nas FABPs	36
3.9.5. Estrutura Terciária	37
3.9.6. Docking Molecular	37
3.9.7 Análises estruturais	38
3.9.8. Análises estatísticas	39
4.1 Efeito da suplementação com ácidos graxos na anidrobiose em <i>P. superbis</i>	40
4.2 Efeito da suplementação com ácido linoleico no crescimento populacional do <i>P. superbis</i>	42
4.3 Expressão gênica de genes envolvidos na metabolização de ácidos graxos	44
4.4 Docking molecular de LBP-3 com ácido mirístico e linoleico	46
4.5 Obtenção de sequências para construção do alinhamento múltiplo	48
4.6 Alinhamento múltiplo entre membros da família das FABPs	51
4.7 Análises estruturais	54
5. Discussão	62
6. Conclusão	71
7. Referências	73
8. Apêndices	86
8.1 Apêndice A – Crescimento populacional.....	86
8.2 Apêndice B – Dados brutos do crescimento populacional após dessecação	87

8.3 Apêndice C – Sequências utilizadas para desenho dos <i>primers</i>	88
8.4 Apêndice D – Teste de dimerização dos <i>primers</i>	90
8.5 Apêndice E – Gráficos de amplificação e de temperatura <i>melting</i>	91
8.6 Apêndice F – Sequências utilizadas para desenho de shRNA bivalente. ...	92
8.7 Apêndice G – Eletroforese dos produtos da transcrição <i>in vitro</i>	94
8.8 Apêndice H – Expressão gênica após realização do silenciamento por shRNA.	95
8.9 Apêndice I – Cladograma de membros da família das FABPs.	96
8.10 Apêndice J – Sequências primárias das FABPs de espécies não anidrobiontes.....	97
8.11 Apêndice K – Sequências primárias das FABPs de espécies anidrobiontes.....	102
8.13 Apêndice L - Aminoácidos mais conservados em um grupo em relação ao outro.	107
8.13 Apêndice M – Resultado da busca no PDB.	108
8.14 Apêndice N – artigos selecionados.....	109
8.15 Apêndice O– descrição da função estrutural dos aminoácidos descritos na literatura.....	110
8.16 Apêndice P – Predição da formação de pontes de sulfeto.	111
8.17 Apêndice Q – Artigos publicados durante o doutorado.....	112
8.18 Apêndice R – Artigo submetido referente a tese.	113

Introdução

1. Introdução

1.1 A anidrobiose

Ambientes com condições extremas podem gerar grande estresse aos organismos habitantes do local, podendo resultar em morte ou em um grande dispêndio de energia a fim de garantirem sua sobrevivência. No entanto, esses ambientes são altamente seletivos e requerem que tais organismos ali presentes possuam capacidades adaptativas ao estresse de modo que sejam resistentes. Uma adaptação conhecida é a entrada em um estado de “animação suspensa”, no qual ocorre a suspensão temporária de atividade biológica, sendo retomada quando o estresse é interrompido (Rebecchi *et al.*, 2007). Esse estado é chamado de criptobiose, termo introduzido por David Keilin em 1959, que vem do grego “vida escondida”. Keilin definiu criptobiose como o estado de um organismo quando este não apresenta sinal de vida observável, nem atividade metabólica mensurável. Atualmente são conhecidas algumas categorias de criptobiose, que variam de acordo com o agente externo causador. Por exemplo: (i) anoxibiose, observada em organismos quem entram em animação suspensa devido à escassez de oxigênio, (ii) criobiose, devido a temperatura extremamente baixa, (iii) quimiobiose, presença de toxinas no meio; (iv) osmobiiose, diferença na pressão osmótica e (v) anidrobiose, baixa umidade relativa (Keilin, 1959; Clegg, 2001), sendo esta última foco do presente trabalho.

A água é conhecida como sendo fundamental para a vida, de tal forma que a desidratação é um severo estressor, cuja intensidade pode resultar em morte. No entanto, em 1702, Antony van Leeuwenhoek descreveu algo contrário a esse paradigma. Ao estudar amostras de poeira de uma calha do telhado, aparentemente sem vida, ele observou que a adição de água revelava a presença de pequenos animais ali presentes. Esses minúsculos espécimes observados eram provavelmente rotíferos bdelóides da espécie *Philodina roseola*, e a descoberta feita por Leeuwenhoek foi a primeira descrição de organismos que possuíam a capacidade de tolerância à dessecação extrema, fenômeno que mais tarde foi chamado de anidrobiose (Leeuwenhoek, 1702; Tunnacliffe e Lapinski, 2003).

O termo anidrobiose foi introduzido pela primeira vez por Alfred Mathieu Giard em 1894, e é derivado do grego que significa “vida sem água”. Giard se referiu à anidrobiose como sendo um estado altamente estável de animação suspensa que um

organismo anidrobiótico entra quando desafiado por dessecação extrema, podendo ser revertido pela reidratação (Figura 1) (Giard, 1894; Tunnacliffe e Lapinski, 2003).

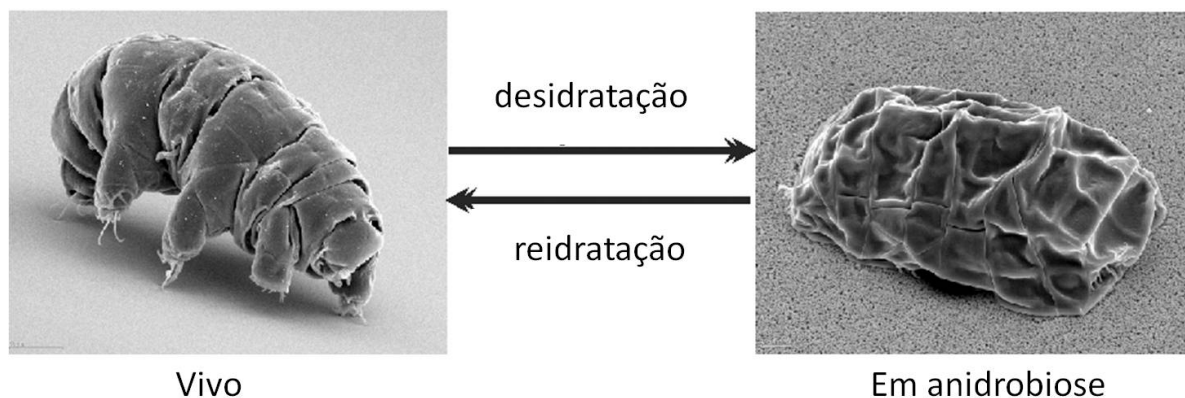


Figura 1- Anidrobiose. *Milnesium tardigradum* no estado ativo (esquerda) e em anidrobiose (direita). Fonte: modificado de (Schokraie et al., 2010) - licença CCBY.

Durante a entrada em anidrobiose, três estágios bem específicos são identificados (Figura 2). Primeiro, a desidratação, em que ocorre a perda de água pelas células, ocorrendo a diminuição do metabolismo e falha das vias bioquímicas. Em resposta ao estresse hídrico, as células acumulam antioxidantes, chaperonas e outras proteínas, como também dissacarídeos (trealose ou sacarose) a fim de manter a viabilidade frente a desidratação. No segundo estágio, a dessecação, em que os níveis de água se tornam extremamente baixos, chegando a 0,1 g/g de massa seca, fazendo com que o metabolismo cesse. As moléculas acumuladas durante a fase de desidratação atuam estabilizando e evitando a agregação de proteínas, e na “reposição” de água prevenindo danos irreparáveis. E o terceiro, denominado seco, em que o citoplasma se transforma em uma matriz orgânica sólida, chamada de biovidro. Este último representa a anidrobiose propriamente dita, que permite que os organismos permaneçam estabilizados por vários anos, como por exemplo, nematoides retirados de amostras seca de solo preservados por 8 anos (Aroian *et al.*, 1993; Tunnacliffe e Lapinski, 2003; McGill *et al.*, 2015; Evangelista *et al.*, 2017).

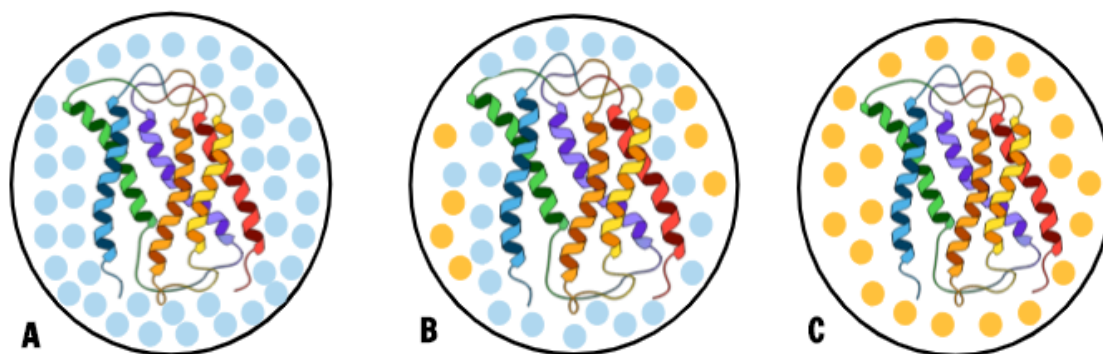


Figura 2- Manutenção da estrutura de moléculas durante a entrada em anidrobiose A) Célula hidratada, em que as moléculas de água (círculos azuis) preservam a estrutura e função das moléculas; B) Início da desidratação, que leva à síntese de dissacarídeos (círculos amarelos), mas que por sua vez ainda não estão atuando na preservação das moléculas; C) Durante a anidrobiose, ocorre a substituição da matriz de água por uma matriz sólida (o biovidro). Fonte: modificado de Evangelista e Pereira (2014).

Atualmente são conhecidos organismos de diferentes táxons com capacidade de entrar em anidrobiose, como por exemplo, bactérias, algas, líquens, musgos, samambaias, nematoides, tardígrados, entre outros (Figura 3). Tais organismos, uma vez que estejam em animação suspensa, são capazes de tolerar diferentes tipos de estresse, como: radiação X e UV, hipóxia, temperaturas extremas, vácuo, etc (Crowe, 1971; Tunnacliffe e Lapinski, 2003). Interessantemente, Wilson e Sherman (2010) observaram que rotíferos anidrobiontes (*Habrotrocha elusa*) eram capazes de se curar de uma infecção letal pelo fungo *Rotiferophthora angustispora*, por meio da anidrobiose, demonstrando que esta última além de conferir tolerância a estresses abióticos, também permite a eliminação de patógenos (estratégia de defesa). Adicionalmente, outros grupos de pesquisa demonstraram o aumento da expressão de moléculas de proteção e de reparo durante a reidratação em diferentes organismos capazes de entrar em anidrobiose – sugerindo um potencial ainda inexplorado, o de recuperação a danos (Oliver *et al.*, 2009; Gusev *et al.*, 2010).

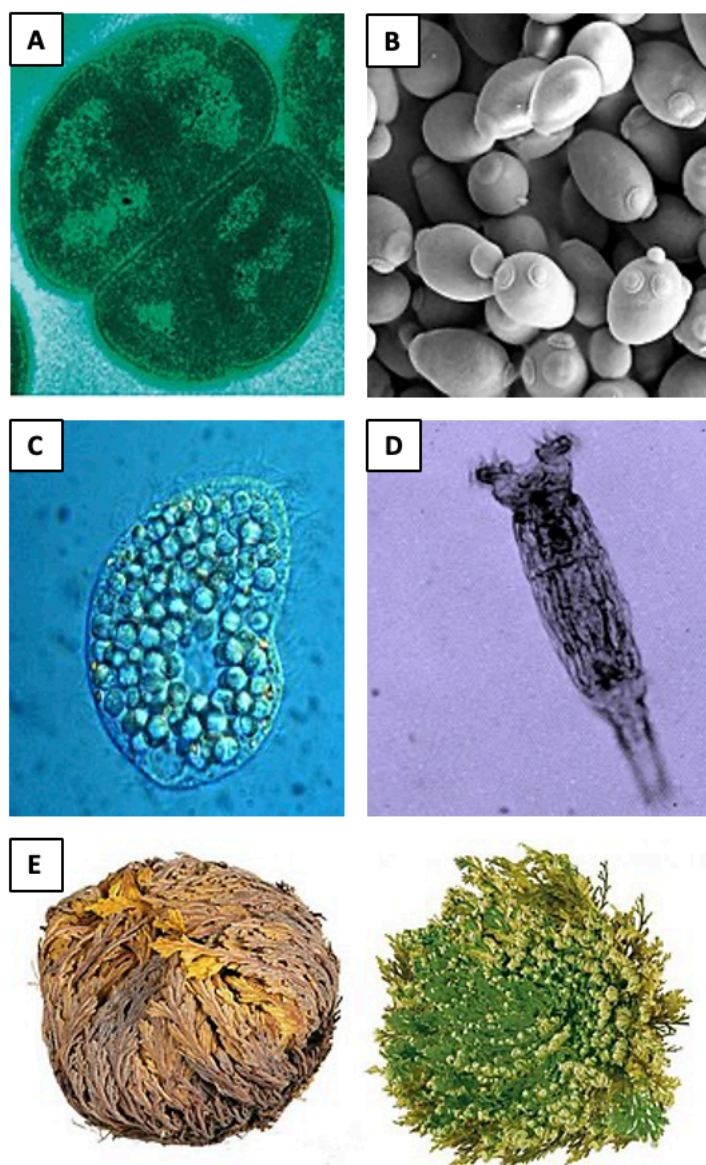


Figura 3- Representantes anidrobiontes de diferentes reinos. A) Monera - *Deinococcus radiodurans*; B) Fungi - *Saccharomyces cerevisiae*; C) Protista - *Colpoda inflata*; D) Animalia - *Philodina roséola*; E) Plantae - *Selaginella lepidophylla*. Licença CCBY.

Estudos sobre anidrobiose se justificam pelo desenvolvimento de uma área chamada de Engenharia Anidrobiótica, que busca aplicar a animação suspensa para a conservação de amostras biológicas a seco. O avanço nessa área pode resultar em grande progresso em diversas outras áreas, como por exemplo, na farmacêutica (aumentando o prazo de validade de vacinas e biomoléculas), na área médica

(preservação de órgãos e tecidos para transplante), na agricultura (ao tornar plantas resistentes à estiagem), etc (Schill *et al.*, 2009; Evangelista *et al.*, 2017). Além disso, é possível idealizar novas perspectivas de aplicação da anidrobiose após a publicação do trabalho de Wilson e Sherman (2010), como a cura de órgãos doentes ou em condições não adequadas para transplante, recuperação de plantações que sofreram algum tipo de dano, entre outros.

Ainda com muito potencial para desenvolvimento, a Engenharia Anidrobiótica já mostra resultados significativos - Hashimoto *et al.* (2016) demonstraram que uma proteína relacionada ao processo de anidrobiose em tardígrados confere aumento da resistência a radiação em células de humanos. Por sua vez, Kim *et al.* (2011) demonstraram que vacinas de microagulhas, estocadas a seco, com trealose, em temperatura ambiente durante um mês foram eficientes em imunizar camundongos contra o vírus influenza.

Em busca de um melhor entendimento do mecanismo de anidrobiose, de forma a contribuir mais e rapidamente para o avanço da engenharia anidrobiótica, nos últimos anos estudos de genomas, transcriptomas e proteomas de espécies anidrobióticas vêm sendo realizados (Tyson *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015). Tais estudos têm contribuindo consideravelmente para o entendimento das bases moleculares da anidrobiose em uma escala mais ampla. No entanto, a anidrobiose se trata de um fenômeno complexo, e apesar dos avanços com análises em larga escala, a área carece de estudos focando individualmente nos potenciais candidatos encontrados e especialmente de análises funcionais, que possibilitem confirmar se determinadas biomoléculas, de fato, estão envolvidas no processo de anidrobiose.

1.2 Modelo de Estudo – *Panagrolaimus superbus*

Entre as diversas espécies anidrobiontes encontra-se o nematoide *P. superbus*, modelo de estudo da presente pesquisa (filo *Nematoda*, classe *Chromadorea* e ordem *Rhabditida*) (Schulze e Schierenberg, 2011). Os indivíduos que compreendem esta espécie apresentam características morfológicas gerais semelhantes a outros organismos do filo *Nematoda*, um corpo cilíndrico, cutícula lisa espessa, boca, uma abertura em forma de anfídeo na região da cabeça, faringe musculosa, intestino e ânus. Na região próxima a faringe possuem um anel nervoso,

poro excretor e papilas sensoriais. Sistema reprodutor feminino contendo ovário, oviduto e poro genital na parte média do corpo; e o masculino contendo testículos e par de espículas copulatórias próximo à região caudal, esta última com forma cônica (Figura 4) (Mehdizadeh *et al.*, 2013).

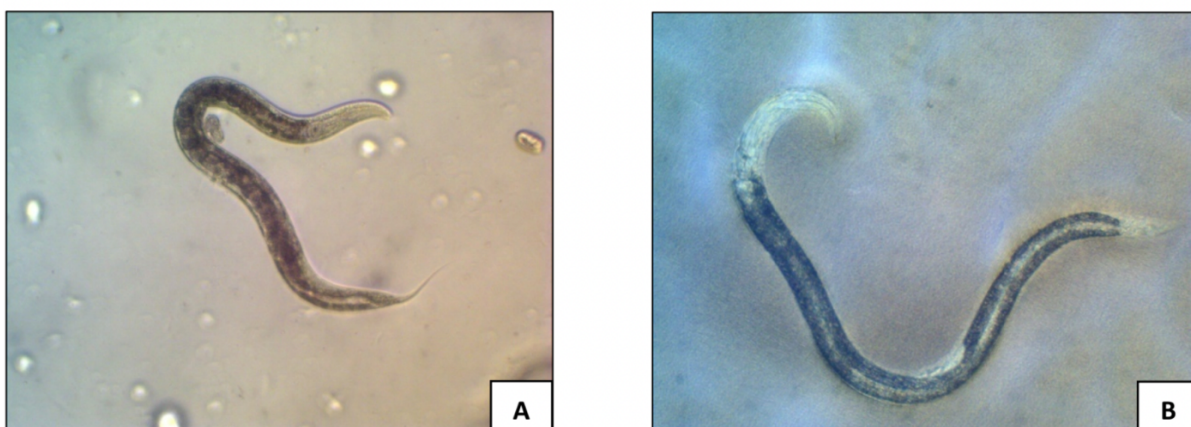


Figura 4- Organismos do filo Nematoda. A) Indivíduo da espécie *C. elegans*; B) Indivíduo da espécie *P. superbus*. Fonte: Guidelli (2011).

O desenvolvimento do *P. superbus* é semelhante ao observado em outros nematoides e se dá pela passagem por quatro estágios diferentes de desenvolvimento larval (L1 – L4) e adulto, que podem ser identificados de acordo com o tempo após a eclosão e o diâmetro do verme. Após a postura do ovo, a eclosão ocorre dentro de um período de 6h, permanecendo então no estágio L1 por 18h até atingir o estágio L2, após um período de mais 48h entra no estágio L3 o qual permanece por 72h até atingir o estágio L4, e após 24h adentrando então na fase adulta (Figura 5) (Evangelista e Pereira, 2014).

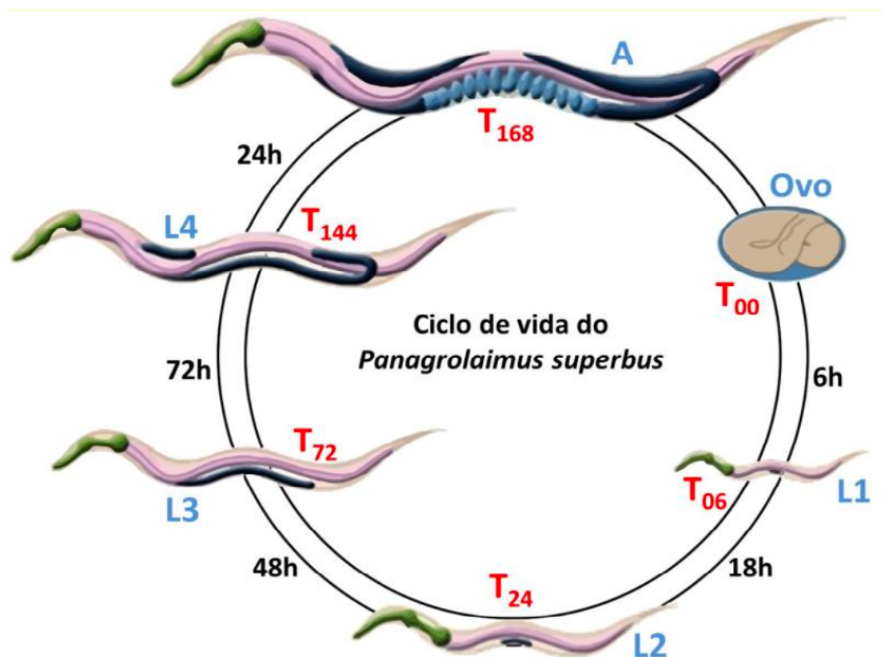


Figura 5- Estágios de desenvolvimento do *P. superbus* com base no tempo de eclosão. L1 – L4 (estágio larval 1 ao estágio larval 4), A (adulto), temperatura: 20 °C. Fonte: Evangelista e Pereira (2014), original modificado de WormAtlas (Altun e Hall, 2005) – licença CCBY-NC.

Os nematoides do gênero *Panagrolaimus* são bacterióvoros, de vida livre, e ocupam uma grande diversidade de ambientes terrestres - polar, temperado e semiárido. Por sua vez, o *P. superbus* foi isolado em 1981 em uma pequena ilha (Surtsey) que compreende o território da Islândia (Bostrom, 1988). Devido aos nichos ocupados, esses organismos estão sujeitos a secas parciais ou severas, assim, apresentam capacidade adaptativa de resistir a dessecação (Mcgill *et al.*, 2015). Nesse contexto, alguns nematoides conseguem sobreviver a desidratação de forma rápida, enquanto outros de forma lenta. O *P. superbus* é classificado com um estrategista rápido, ou seja, é capaz de resistir a dessecação extrema imediata, não necessitando de períodos de pré-condicionamento com reduções moderadas da umidade relativa (Shannon *et al.*, 2005). Desta forma, considera-se que esta espécie apresente adaptações bioquímicas para resistir ao estado anidrobiótico, podendo ser considerado como um excelente organismo modelo para o melhor entendimento acerca da anidrobiose.

1.3 As Proteínas Ligantes de Ácido Graxo (FABPs)

O transporte de ácidos graxos nas células é um processo complexo e dinâmico que afeta diversos aspectos da atividade celular. Dentre as principais funções dos ácidos graxos podem-se citar como componente da molécula de triacilglicerol – sendo uma importante fonte de energia, na formação de lipídios complexos, como, fosfolipídios e colesterol, e também como hormônios e moléculas de sinalização para regulação do metabolismo (Chmurzyńska, 2006). Mais especificamente no contexto da anidrobiose, alguns trabalhos sugerem que essas moléculas também estejam envolvidas, como observado em Rozenfelde e Rapoport (2014), no qual concluem sobre a importância da integridade da membrana celular em *Saccharomyces cerevisiae* para manter a viabilidade do organismo após a dessecação. Watanabe *et al.* (2005) demonstraram que mesmo na ausência de um cérebro, os tecidos ricos em gordura da larva do *Polypedilum vanderplanki* resistiam com sucesso a entrada em anidrobiose, mantendo-se preservado de maneira viável por um longo período. No cenário de mudanças climáticas, que afetam diretamente o habitat de organismos anidrobiontes, Tanaka *et al.* (1996) observaram que variações de temperatura resultavam em alteração da composição dos fosfolipídios de membrana em *C. elegans*, que de acordo com Dupont *et al.* (2014) pode alterar a viabilidade após um período em animação suspensa.

Entretanto, os ácidos graxos são moléculas hidrofóbicas, portanto, não apresentam boa solubilidade em meio aquoso, necessitando de proteínas sem atividade catalítica para o transporte entre os compartimentos celulares – peroxissomos, mitocôndria, retículo endoplasmático, gotículas de lipídio e núcleo (Figura 6). Dentre as proteínas que exercem tal função encontra-se as FABPs, que por sua vez são um grupo de moléculas que coordenam a resposta lipídica na célula e estão relacionadas a diferentes vias metabólicas e inflamação (Furuhashi e Hotamisligil, 2008). As FABPs são proteínas abundantemente expressas, com ~15KDa, que se ligam de forma reversível a ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa e outros lipídios, apresentando grande afinidade por essas moléculas. Essas proteínas são membros de uma família multigênica para as quais é estimado ter ocorrido o primeiro evento evolutivo de duplicação a partir de um gene ancestral por volta de 1000 mya por, assim gerando um grande número de homólogos tecido-específicos. A organização gênica é similar entre os membros da família, em quatro

éxons espaçados por três íntrons de tamanho variável, de acordo com o membro da família; além disso, vários “*enhancers*” foram identificados, que por sua vez regulam a expressão tecido-específica (Storch e Corsico, 2008).

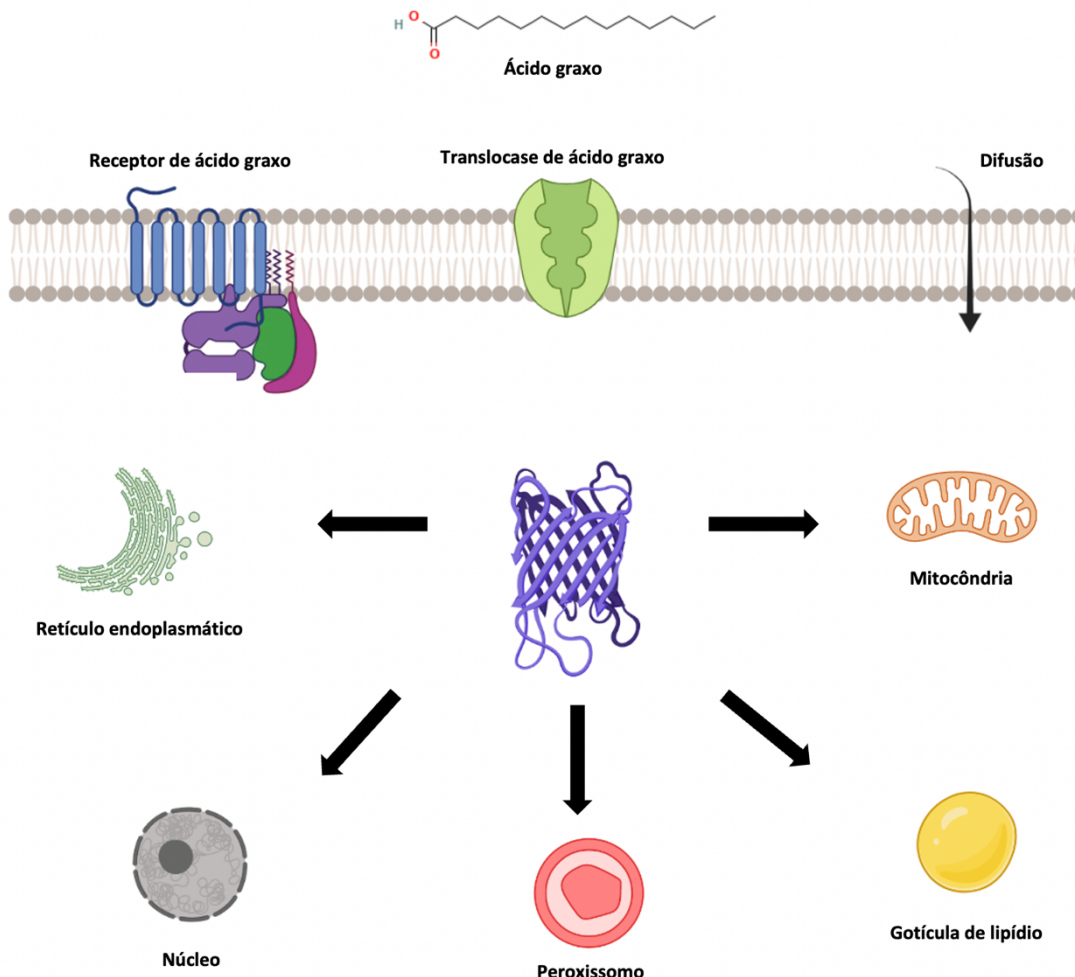


Figura 6- Função das proteínas FABPs. Consideradas chaperonas de lipídios, as FABPs têm como função o transporte de ácidos graxos para os diversos compartimentos celular: para o retículo endoplasmático - sinalização, transporte e síntese de membranas; para o núcleo – regulação de fatores de transcrição mediados por lipídios; mitocôndrias e peroxissomos – oxidação; gotículas de lipídio – estocagem. Fonte: modificado de Mckillop et al. (2019).

No genoma humano são conhecidos nove genes que codificam para proteína, tendo cada FABP seu nome atribuído ao tecido ao qual foi primeiramente identificada ou apresenta maior expressão – fígado (L-FABP; FABP1), intestino (I-FABP; FABP2), coração (H-FABP; FABP3), adipócito (A-FABP; FABP4), epiderme (E-FABP; FABP5),

íleo (IL-FABP; FABP6) cérebro (B-FABP; FABP7), mielina (M-FABP; FABP8), testículo (T-FABP; FABP9), e a FABP 12, a qual não é muito bem descrita (Smathers e Petersen, 2011). Por sua vez, em *C. elegans*, um nematodo anidrobionte, são conhecidas nove FABPs (FABP1 a FABP9) (Tillman *et al.*, 2019). De forma geral, podem ser divididas em dois grupos, associadas a membrana plasmática e as intracelulares ou citoplasmáticas (Chmurzyńska, 2006).

À medida que os papéis dessas proteínas vêm sendo elucidados, mais funções biológicas são atribuídas a elas. No entanto, no contexto da anidrobiose, não existem estudos associando diretamente as FABPs ao processo de animação suspensa ou retomada do mesmo; porém, alguns estudos demonstraram evidências substanciais de que possam estar envolvidas. Por exemplo, Tyson *et al.* (2012), em um estudo com o nematode anidrobionte *P. superbus*, identificaram um transcrito (número de acesso no NEMBASE4: PSC00876) com similaridade a proteína ligante de lipídeo (LBP-3) de *C. elegans* (número de acesso no Uniprot: NP_001041249), constitutivamente expresso em condição de não estresse, o que pode ser sugestivo de um papel importante na homeostase celular para estes organismos. Por sua vez, Martell *et al.* (2016) demonstraram em *C. elegans* mutante para o gene *daf-2*, que o silenciamento do gene *lbp-3* aumentava a longevidade e formação de *dauer* (estágio alternativo de desenvolvimento de *C. elegans* resistente a dessecação). Por outro lado, O'rourke *et al.* (2013) demonstraram que a super expressão de *lipl-4* em *C. elegans*, mimetizando condição de privação de alimento (estresse), sinalizava para o aumento da expressão do gene *lbp-3* e também, aumento da circulação de ácidos graxo poli-insaturados, que por sua vez, levava ao aumento da autofagia e conseqüentemente ao aumento da longevidade nos vermes. Tais estudos sugerem que as FABPs podem estar envolvidos em vias metabólicas importantes para os organismos anidrobiontes, mas até então com seu papel pouco explorado. Além disso, a exata função biológica para essas proteínas, e se possuem características particulares nos organismos anidrobiontes, não estão claras (Storch e Corsico, 2008; Martell *et al.*, 2016).

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Avaliar se a suplementação de ácidos graxos na dieta do nematoide *P. superbus* afeta sua tolerância a dessecação extrema, assim como avaliar o envolvimento de genes do metabolismo de ácidos graxos na anidrobiose, e caracterizar estruturalmente a proteína LBP-3.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito da suplementação com ácido mirístico (ácido graxo saturado) na dieta do nematoide *P. superbus* na sua tolerância a dessecação extrema;
- b) Avaliar o efeito da suplementação com ácido linoleico (ácido graxo poli-insaturado) na dieta do nematoide *P. superbus* na sua tolerância a dessecação extrema;
- c) Examinar o nível de expressão gênica de *lbp-3*, *nhr-49* e *fat-5* durante a indução da anidrobiose em *P. superbus*;
- d) Identificar a sequência primária de proteínas homólogas às LBPs de *C. elegans* em espécies anidrobiontes e não anidrobiontes;
- e) Examinar a sequência primária das proteínas homólogas às LBPs de *C. elegans* de espécies anidrobiontes e não anidrobiontes a fim de identificar regiões com diferentes níveis de conservação entre os grupos, com potencial de representar assinaturas moleculares da anidrobiose;
- f) Construir um modelo tridimensional de LBP-3 de *P. superbus*;
- g) Caracterizar LBP-3 de *P. superbus* avaliando a implicação das assinaturas moleculares da anidrobiose observadas em nível de sequência primária na estrutura tridimensional da proteína.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Manutenção do *P. superbis*

Os nematoides da espécie *P. superbis* (linhagem DF5050) foram cultivados à 20°C, no escuro, em placas contendo ágar NGM (nematode growth medium) com uma camada de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) (linhagem OP50) utilizadas como alimento (Evangelista *et al.*, 2017).

3.2. Manipulação dos Nematoides para Análises

Populações mistas (machos e fêmeas em diferentes estágios de desenvolvimento) foram coletados das placas de manutenção adicionando-se 3 mL da solução tampão M9, seguido por homogeneização com a pipeta para “lavar” as placas e, em seguida, os vermes em suspensão na solução tampão foram depositados em tubo falcon de 15 mL. O procedimento foi repetido ao total duas vezes, para garantir a coleta do maior número de animais das placas. Uma vez depositados nos tubos, o volume foi completado para 10 mL adicionando-se solução tampão de M9 e aguardado 15 min para a completa deposição dos vermes ao fundo do tubo; o sobrenadante contendo impurezas proveniente das placas e bactérias foi removido, restando então 2 mL de solução com os vermes no final. O procedimento foi repetido ao total três vezes, para assegurar a completa limpeza da solução. Em seguida, o número de vermes foi contado por amostragem por meio da coleta de duas alíquotas de 20 µL, e o total de vermes foi estimado em relação ao volume total de solução no tubo (Evangelista *et al.*, 2017).

3.3. Suplementação com Ácidos Graxos

Inicialmente foi adicionado o detergente Tergitol (tipo NP-40, Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 1% ao NGM para facilitar a dissolução dos ácidos graxos. Então, os ácidos mirístico ($\geq 99\%$, $C_{14}H_{28}O_2$, Sigma-Aldrich) ou linoleico ($\geq 99\%$, $C_{18}H_{32}O_2$, Sigma-Aldrich), a uma concentração final de 0,8 mM ou 4 mM, foram adicionados ao NGM para a confecção das placas. Após a montagem das placas, as mesmas foram armazenadas por 24h em temperatura ambiente, no escuro, e posteriormente cobertas com *E. coli*, armazenadas em temperatura ambiente, no

escuro, por 48h antes da adição dos animais, para assegurar a incorporação dos ácidos graxos pelas bactérias. Aproximadamente 200 vermes, em todos os estágios de desenvolvimento, foram adicionados e mantidos nas placas suplementadas com os ácidos graxos por um período de três ou dez dias previamente às análises de viabilidade. O grupo controle foi adicionado pelo mesmo período em placas contendo apenas o detergente Tergitol (Deline *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2017).

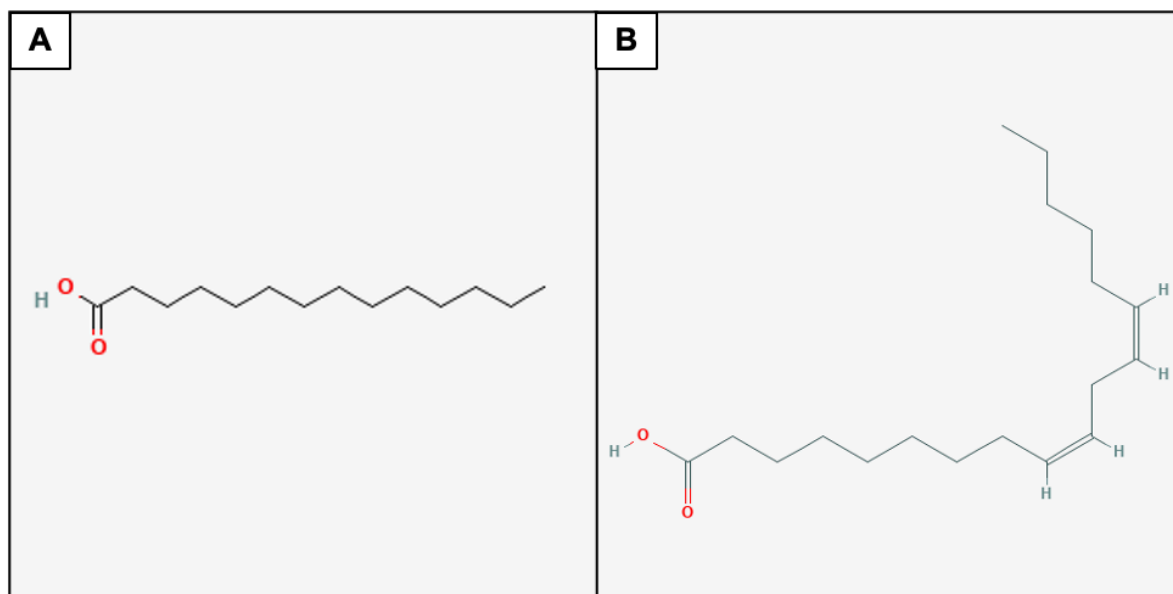


Figura 7- Estrutura das moléculas de ácidos graxos. A) Estrutura da molécula de ácido mirístico; B) Estrutura da molécula de ácido linoleico. Licença CC0.

3.4. Dessecação

A indução da dessecação nos animais foi realizada por meio da transferência dos vermes para membranas de filtro supor 0,45 μm (Sigma-Aldrich) por filtração a vácuo utilizando um Kitassato, colocados em tubos de 1,5 mL, e então submetidos ao desafio da dessecação em câmaras com as seguintes condições: 24h em sulfato de cobre [umidade relativa (UR) 98%], 7 dias em sílica gel UR < 10%, 100% UR por 24h para pré-reidratação com vapor de água destilada e em seguida reidratados por 1h em solução tampão M9 (Shannon *et al.*, 2005).

3.5. Extração de RNA

Um total de cinco mil vermes foram macerados com cadinho e pistilo em nitrogênio líquido, então foi adicionado 0,5 mL de Trizol (ThermoFisher), e a solução formada foi transferida para um tubo de 1,5 mL. Posteriormente, a extração do RNA foi realizada de acordo com os seguintes passos: o tubo contendo a solução de Trizol e amostra foi encubado por 5 min em temperatura ambiente; adicionado 0,1 mL de clorofórmio (Sigma-Aldrich) e homogeneizado vigorosamente com as mãos; o tubo foi encubado por 3 min em temperatura ambiente, e centrifugado à 12,000 x *g* por 15 min à 4 °C; após a centrifugação, foi removida a fase líquida e transferida para um novo tubo; então foi adicionado 0,25 mL de isopropanol 100% (Sigma-Aldrich) e o material armazenado *overnight* à 20 °C. No dia seguinte, o material foi colocado por 10 min em temperatura ambiente e levado para centrifuga à 12,000 x *g* por 10 min à 4 °C; o sobrenadante foi removido por inversão e ao pellet foi adicionado 0,5 mL de etanol 75% (o agitador do tipo vórtex foi utilizado brevemente para remoção do pellet do fundo do tubo); após, o tubo foi centrifugado à 7,500 x *g* por 5 min à 4 °C; o sobrenadante foi removido por inversão e o tubo deixado para secar ao “ar” por entre 5 e 10 min. Por fim, o RNA foi ressuscitado em 20 µL de água ultra pura (ThermoFisher), e quantificado com biodrop (ThermoFisher) (Green e Sambrook, 2020).

3.6. Desenho dos *primers*

Para o desenho dos *primers*, uma vez que o *P. superbis* não é uma espécie com o genoma sequenciado, inicialmente foi obtida a sequência primária para as proteínas LBP-3 (CCD70143.1), FAT-5 (CAB04924.1) e NHR-49 (CAD57703.1) de *C. elegans*, e então realizado uma busca por homólogos no banco de dados de ESTs (marcador de sequência expressa – tradução livre do termo em inglês “*expressed sequence tag*”) de *P. superbis* utilizando a ferramenta tBLASTn. Os melhores resultados foram anotados, e foram selecionadas as sequências cujas análises reversas via BLASTx resultaram na mesma sequência de *C. elegans* utilizada na busca inicial; com exceção para o *nhr-49*, cuja busca foi feita utilizando-se o banco de dados de WGS (sequenciamento *shotgun* – tradução livre do termo em inglês “*whole genome shotgun*”). Dessa forma, as sequências de *P. superbis* selecionadas para o

desenho dos *primers* foram: *lbp-3* (GW406630.1), *fat-5* (GW410416.1) e *nhr-49* (CABFKN010010885.1:475-1281). Após a seleção das sequências, o desenho dos *primers* foi realizado utilizando a ferramenta *Primer 3 Plus*, de acordo com os parâmetros definidos em Thornton e Basu (2011). A sequência do *primer* utilizado como controle endógeno (*rpl-32*) foi retirada de (Tyson *et al.*, 2012).

Tabela 1. Sequência dos *primers*.

Número acesso	Gene	Primer	Sequência 5`-> 3`
GW406630.1	<i>lbp-3</i>	F	CGAAGGTGAGGGAATGGATGG
		R	CCAACGTTTTGCAGTAACACCT
GW410416.1	<i>fat-5</i>	F	ACTTGGACTTCATTGGTGGCA
		R	ACTGGCATTTCCTGTTTCCGA
CABFKN010010885.1:475-1281	<i>nhr-49</i>	F	AGCAGCTTCCACCATTTCCTCA
		R	TCAGGAGATCGAAAAGCCGG
GW412548.1	<i>rpl-32</i>	F	GTTTCGTAGACGTTTCAAGGGTACT
		R	TCGAGATCTCTGACATTATTGACG

3.7. Análise do perfil de expressão gênica

Para determinar se os genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos de *P. superbis* estão envolvidos com o processo de anidrobiose, foi avaliado o perfil de expressão gênica nos seguintes tempos: 0h (animais coletados imediatamente das placas); 24h (animais submetidos por 24h em câmara de pré-condicionamento à dessecação com CuSO₄) (Fu *et al.*, 2020).

A expressão relativa dos genes *fat-5*, *nhr-49* e *lbp-3* foi avaliada a partir do RNA total. Um micrograma de cada amostra de RNA foi tratado com o kit DNase I – Amplification Grade (Sigma-Aldrich), e posteriormente foi utilizado para síntese de cDNA utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific). A reação de RT-qPCR foi realizada com 62,5 ng de cada amostra em um volume final de 10 µL, em triplicatas, utilizando-se o kit qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX (PCR Biosystems), juntamente com os *primers forward* e *reverse* (75 nM). Para a leitura do RT-qPCR foi utilizado o equipamento CFX96 (Bio-Rad), considerando as seguintes condições de reação: 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 5 seg / 64°C por 30 seg, 65°C-95°C por 5 seg. A expressão relativa do transcrito foi quantificada usando o método $\Delta\Delta C_t$ e normalizada para a expressão de *rpl*.

3.8. Ensaio de viabilidade

Para a verificação da viabilidade dos animais após a realização dos experimentos, os vermes foram expostos ao corante eritrosina B (0,4% w/v em tampão de M9 - Sigma-Aldrich) por um período de 1h. Após, foi realizada a lavagem da amostra com o tampão M9 para remoção do excesso do corante. As células dos animais mortos perdem a seletividade de membrana, assim apresentando coloração, à medida que as células dos animais vivos mantêm a seletividade da membrana, não apresentando coloração. Dessa forma, a viabilidade foi determinada dividindo-se o número de vermes vivos pelo total de vermes ($n = 200$ animais por grupo; triplicata) (Krause *et al.*, 1984; Evangelista *et al.*, 2017).

3.9. Análises *in silico*

3.9.1. Obtenção de sequências primárias de FABPs

Para as análises *in silico*, a partir da sequência primária das nove LBPs de *C. elegans* (LBP1 a LBP9) foi realizado a busca por sequências homólogas em espécies anidrobiontes e não anidrobiontes. Para os não anidrobiontes a busca foi realizada utilizando a ferramenta BLASTp. Para anidrobiontes, quando não foi possível obter a sequência primária proteica devido a ausência de sequências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foi utilizado a ferramenta tBLASTn para a busca por sequências identificadas por etiquetas de sequência expressa (ESTs) – posteriormente a suposta sequência primária foi predita utilizando a ferramenta ORFfinder. Foi considerado apenas o melhor resultado, sendo que o mesmo deveria apresentar $e\text{-value} \leq 1e-10$. As espécies utilizadas para busca foram retiradas de uma lista construída ao longo dos anos por membros de nosso laboratório, contendo espécies descritas como anidrobiontes na literatura. Dessa forma, foi realizada a busca em todas as espécies anidrobiontes da lista e realizada a busca pelo número equivalente de sequências em espécies não anidrobiontes. Todas as sequências obtidas estão apresentadas nos apêndices I e J (Altschul *et al.*, 1990; Wheeler *et al.*, 2003).

3.9.2. Alinhamento Múltiplo

Os alinhamentos múltiplos das sequências entre os organismos não anidrobiontes e anidrobiontes foi realizado através da ferramenta Muscle (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) com as configurações padrão. Para a visualização do alinhamento foi utilizado o programa JalView, considerando como parâmetro conservação por identidade de 50% para cada grupo (Edgar, 2004; Waterhouse *et al.*, 2009).

3.9.3 Análise dos Aminoácidos Divergentes Entre os Grupos

As sequências foram submetidas a análises de conservação por identidade de um determinado aminoácido, em uma dada posição, de um grupo em relação ao outro grupo. Dessa forma, foram identificadas as posições em que um determinado aminoácido apresentava identidade de pelo menos 50% em um dos grupos, e então, considerado o número de sequências apresentando o mesmo aminoácido no outro grupo. A razão entre os grupos deveria ser de pelo menos o dobro (razão $\geq 2,0$).

$$\frac{n^{\circ} \text{ de espécies que conservam um aminoácido dentro do grupo}}{n^{\circ} \text{ de espécies que conservam o aminoácido dentro do outro grupo}} = \geq 2,0$$

3.9.4. Identificação de potenciais aminoácidos com função nas FABPs

Para a identificação de aminoácidos com função estrutural já descritos na literatura no alinhamento múltiplo entre as sequências primárias das FABPs, foi realizado o seguinte procedimento. Inicialmente, a sequência de LBP-3 de *C. elegans* (NP_001379901.1) foi utilizada como “isca” para a busca no *Protein Data Bank* (PDB) por estruturas de FABPs já resolvidas. Dentre as estruturas encontradas, os oito melhores resultados foram selecionados - 6I8X, 6I9F, 5HZ8, 2A0A, 4LKT, 1JJJ, 6C1Z e 4LKP (Tabela 6; Apêndice M); as quais foram utilizadas para a construção dos termos utilizados para a busca de artigos descrevendo aminoácidos com funções conhecidas nas bases de dados “pubmed” e “google scholar”. Os termos utilizados foram:

Tabela 2. Termos utilizados para levantamento bibliográfico.

Palavras chave	Google scholar	Pubmed
"As-p18" and "structure" and "ascaris"	42	3
"As-p18" and "structure" and "fatty acid binding"	52	4
"FABP4" and "homo sapiens" and "structure"	49	388
FABP4 and "homo sapiens" and "structure" and "fatty acid binding protein"	-	42
FABP4 and "structural analysis" and "human" and "adipocyte FABP"	10	-
"adipocyte fatty acid binding protein" and "human" and "structural analysis"	-	33
FABP5" "structure" and "human"	-	50
(FABP5) AND (structure) and (human) and (structural analysis) and (conservation)	431	-
(lbp8) and (Caenorhabditis elegans)	3	105
lbp8	-	5

Após o levantamento dos artigos, eles foram analisados em busca da descrição de aminoácidos com função estrutural e/ou na ação da proteína, e então selecionados (Tabela 7; Apêndice N). Por fim, a identificação no alinhamento foi realizada seguindo dois critérios: posição com razão de conservação por identidade $\geq 2,0$ e descrição

3.9.5. Estrutura Terciária

A sequência primária da proteína LBP-3 de *P. superbis* (derivada do ID NCBI: GW406630.1) foi submetida ao servidor do Alphafold 2 para predição do modelo estrutural. Inicialmente, foram realizados alinhamentos entre a sequência e os modelos usando o MMseq2 e HHsearch (refHHsearch). O campo de força Amber (REFAmber) foi utilizado para o relaxamento pós-predição dos modelos de modo a determinar a melhor geometria das ligações peptídicas. Os múltiplos alinhamentos de sequência (MSA) e opções de pareamento foram realizados de acordo com as configurações padrão. A qualidade dos modelos foi avaliada de acordo com os seguintes parâmetros: Acurácia e confiança das regiões nos modelos de acordo com o *score* de confiança por resíduo (pLDDT), as quais deveriam apresentar *score* maior que 70 (Hornak *et al.*, 2006; Steinegger e Soding, 2017; Steinegger *et al.*, 2019; Jumper *et al.*, 2021).

3.9.6. Docking Molecular

O modelo predito de LBP-3 foi carregado no programa PyRx *virtual screening tools* e definido como macromolécula. Em seguida, os ligantes ácido mirístico (PubChem: 11005) e ácido linoleico (PubChem: 5280450) foram inseridos no programa, tiveram a energia minimizada, e foram convertidos para o formato pdbqt. Após a seleção das moléculas de proteína e ligantes, o *grid box* (25 x 25 x 25 Å) foi automaticamente definido nas posições espaciais: X = 1,1055; Y = -3,0132; Z = -2,8834. O *docking* foi realizado com a ferramenta autodock Vina (Dallakyan e Olson, 2015). Por fim, a visualização das interações entre a proteína e os ligantes foi realizada utilizando o programa Discovery Studio Visualizer (Biovia, 2017).

3.9.7 Análises estruturais

Da realização das análises estruturais do modelo predito, inicialmente utilizou-se a ferramenta Dali a fim de encontrar proteínas com estrutura experimentalmente resolvidas e depositadas no PDB (Holm, 2022). Após a identificação das proteínas mais semelhantes, foi realizada a sobreposição entre o melhor resultado e o modelo utilizando o programa PyMOL (Schrödinger e Delano). A métrica utilizada para a realizar a sobreposição entre as estruturas foi o RMSD (raiz quadrada do desvio quadrático médio – tradução livre do inglês “*Root Mean Square deviation*”).

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_{i1} - x_{i2})^2 + (y_{i1} - y_{i2})^2 + (z_{i1} - z_{i2})^2}$$

Figura 8. Equação para cálculo do RMSD. Calculado considerando as diferenças para cada coordenada (x, y e z) de duas moléculas elevado ao quadrado, somadas, divididas pelo número total de átomos (média), e por fim realizada a raiz quadrada. n: número total de átomos; x, y, z: coordenadas; Σ : soma. Retirado de: OnlineBioinfo.

Para o cálculo do potencial eletrostático de superfície da proteína, o modelo foi inicialmente preparado com a ferramenta pdb2qr – que corrige erros e determina parâmetros necessários para o cálculo, como reconstrução de átomos perdidos, adição de átomos de hidrogênio, atribui cargas atômicas e os raios de campos de forças especificados, como também, converte o arquivo para o formato PQR. Após a preparação do modelo, o potencial eletrostático de superfície foi determinado

utilizando o programa APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) (Jurrus *et al.*, 2018). Identificação de peptídeo sinal foi realizada com a ferramenta SignalP 6.0 (disponível em: <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>). Para a predição da sequência foram selecionadas as opções “*eukarya*” e “*long output*” como formato de busca e retorno dos dados, respectivamente, e o modo de predição como sendo “*slow*” (Teufel *et al.*, 2022). A localização celular da proteína foi predita utilizando a ferramenta LocTree 3 (Goldberg *et al.*, 2014). A predição da formação de pontes de sulfeto foi realizada com o servidor disponível online DiANNA 1.1 (Ferrè e Clote, 2006). A hidrofobicidade e hidrofiliabilidade foram determinadas utilizando a escala de hidropaticidade de Kyle e Doolittle (Kyte e Doolittle, 1982).

3.9.8. Análises estatísticas

Todos os experimentos que envolveram o uso dos animais foram realizados em triplicatas técnicas. Inicialmente, a normalidade dos dados foi testada através do teste de Shapiro-Wilk. Então, os dados com distribuição normal foram analisados utilizando o teste ANOVA de uma via ou teste t de *Student*, enquanto que os dados que não apresentavam distribuição normal foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis. Os programas utilizados para a análise dos dados foram o SPSS (versão 21.0) e o GraphPad Prism (versão 5.0). O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

4.1 Efeito da suplementação com ácidos graxos na anidrobiose em *P. superbus*

Para verificar se a suplementação com ácidos graxos na dieta do nematoide *P. superbus* altera sua tolerância a dessecação extrema, os vermes foram cultivados em meio de cultura NGM suplementado com 0,8 mM e 4 mM de ácido mirístico (saturado) ou ácido linoleico (poli-insaturado) por um período de 3 e 10 dias (Figura 9). Foi observado que a suplementação com o ácido linoleico por 3 dias com ambas as concentrações testadas seguido do desafio de dessecação extrema (anidrobiose) resulta na diminuição da tolerância/viabilidade (76,87% na concentração de 0,8 mM; 82,02% na concentração de 4 mM) do *P. superbus* quando comparado com animais que não foram submetidos ao desafio da dessecação extrema [$F(5, 12) = 6,275; p \leq 0,05$]; [$F(5, 12) = 3,282; p \leq 0,05$] (Figuras 9A-B). Por outro lado, a suplementação por um maior período de tempo, 10 dias, não interferiu na tolerância a anidrobiose na espécie.

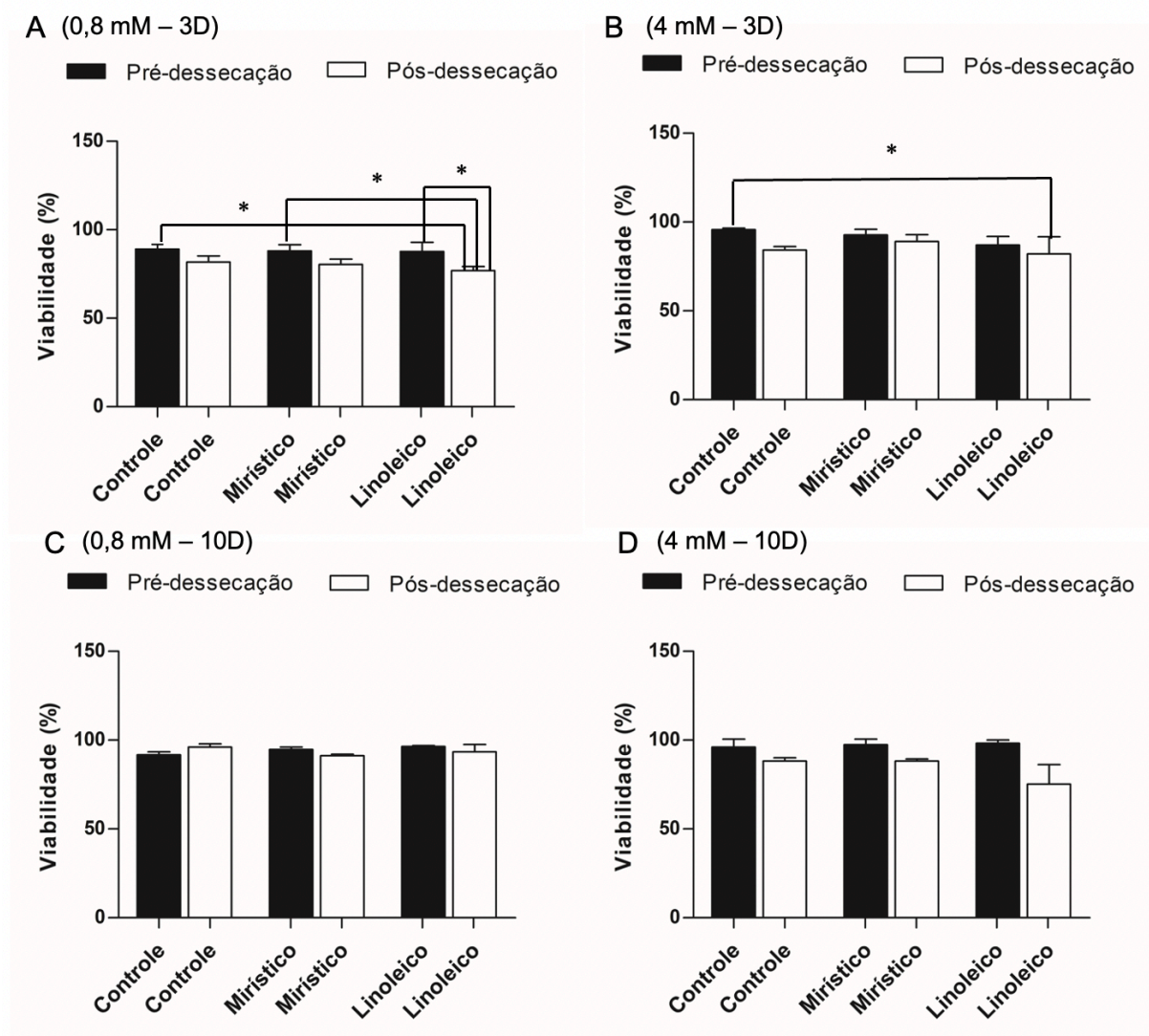


Figura 9. Efeito da suplementação com ácidos graxos na tolerância a anidrobiose do *P. superbis*. A) suplementação com 0,8 mM por 3 dias; B) suplementação com 4 mM por 10 dias; C) suplementação com 0,8 mM por 10 dias; suplementação com 4 mM por 10 dias. Barras em preto: viabilidade dos vermes em condição hidratada; Barras em branco: viabilidade dos vermes após dessecação extrema. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$. $n = 200$ vermes por grupo; ensaios realizados em triplicata técnica.

4.2 Efeito da suplementação com ácido linoleico no crescimento populacional do *P. superbis*.

Durante a realização do ensaio de suplementação com ácidos graxos no efeito na tolerância a anidrobiose, para o período de 10 dias nas placas contendo ácido linoleico (0,8 mM e 4 mM) foi observada uma aparente diminuição no tamanho da população em comparação aos outros dois grupos (não suplementado e suplementado com ácido mirístico). Dessa forma, foi avaliado o efeito da suplementação com 0,8 mM de ácido linoleico durante um período de 20 dias no crescimento populacional do *P. superbis*. Foi observado que o ácido linoleico levou a redução no tamanho populacional quando comparado ao grupo cultivado em placas não suplementadas ($p \leq 0,05$) (Figura 10A). Adicionalmente, baseado no possível potencial de reparo a danos associado ao processo anidrobiótico (Gusev *et al.*, 2010; Pazos-Rojas *et al.*, 2019; Bosch *et al.*, 2021), foi testado se a anidrobiose poderia reverter o fenótipo de menor crescimento populacional induzido pela suplementação com ácido linoleico. Dessa forma, após 20 dias em placas de cultivo padrão (controle) ou suplementadas com ácido linoleico os animais foram induzidos a anidrobiose, e após uma semana foram reidratados e cultivados por 20 dias em placas de cultivo padrão. No entanto, foi observado que a anidrobiose não foi capaz de reverter o menor crescimento populacional (Figura 10B). Foi realizado um experimento controle no qual os animais foram inicialmente cultivados durante 20 dias em condições de cultivo padrão ou de suplementação com ácido linoleico e então 200 animais foram transferidos para placas de cultivo padrão e após 20 dias determinado o crescimento populacional ($p \leq 0,05$) (Apêndice A).

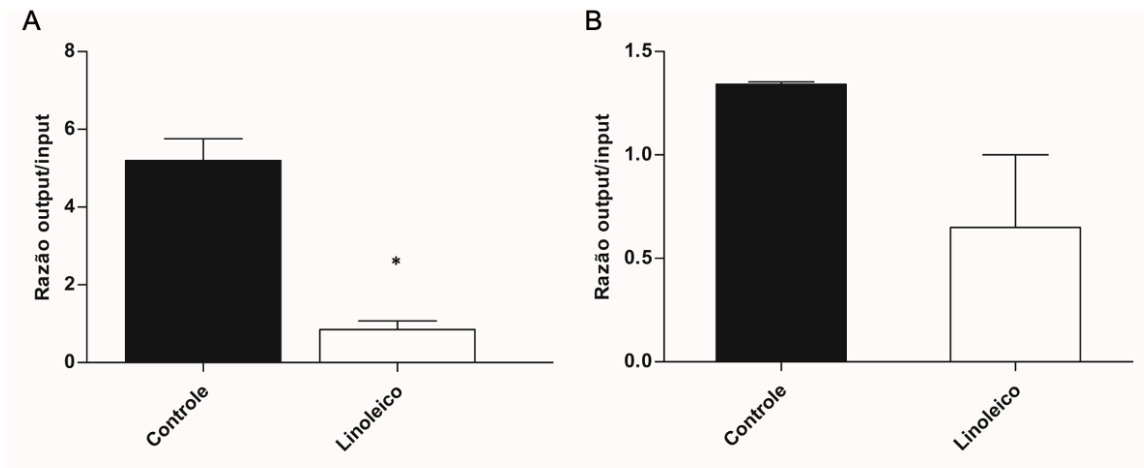


Figura 10. Efeito da suplementação com ácido linoleico no crescimento populacional do *P. superbus*. A) Razão de crescimento populacional após 20 dias de cultivo em placas de cultivo com NGM padrão (barra em preto) e em NGM suplementado com ácido linoleico (barra em branco); B) Razão de crescimento populacional após indução da anidrobiose. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$; n = 200 vermes por grupo; ensaios realizados em triplicata. Em (B), para o grupo controle foi removido um outlier (duplicata) (vide apêndice 8.2 para dados brutos).

4.3 Expressão gênica de genes envolvidos na metabolização de ácidos graxos

Em nematoides, ácidos graxos são adquiridos majoritariamente por meio da alimentação, a partir das bactérias utilizadas como fonte de alimento, dos quais a maior parte são saturados e monoinsaturados (Kaul *et al.*, 2014). A metabolização de ácidos graxos em nematoides, isto é, a biossíntese de ácidos graxos mono e poli-insaturados a partir de ácidos graxos saturados e a incorporação dos mesmos passa pela atividade enzimática das delta-9 ($\Delta 9$) dessaturases (Brock *et al.*, 2007). Adicionalmente, de acordo com Van Gilst, Hadjivassiliou e Yamamoto (2005), o receptor nuclear NHR-49 (homólogo ao receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa - PPAR α encontrado em mamíferos) é de fundamental importância para a atividade das $\Delta 9$ dessaturases. E por sua vez, NHR-49 é ativado por membros da família das FABPs capazes de transportar ácidos graxos para o núcleo, como por exemplo, LBP-8 (proteína ligante de lipídio 8 – *lipid binding protein 8*) (Folick *et al.*, 2015). Dessa forma, foi verificado o nível de expressão gênica relativa dos três genes em condição normal (hidratado) e durante a entrada em anidrobiose (após 24h em câmara contendo CuSO₄). Foi observado que todos os três genes apresentaram expressão diferencial durante a entrada no estado anidrobiótico ($p \leq 0,05$), sugerindo o envolvimento dos mesmos com o processo. De forma interessante, o gene *lbp-3* foi o que apresentou maior alteração, se mostrando 5 vezes mais expresso, enquanto que *fat-5* e *nhr-49* apresentaram nível de expressão reduzido aproximadamente pela metade.

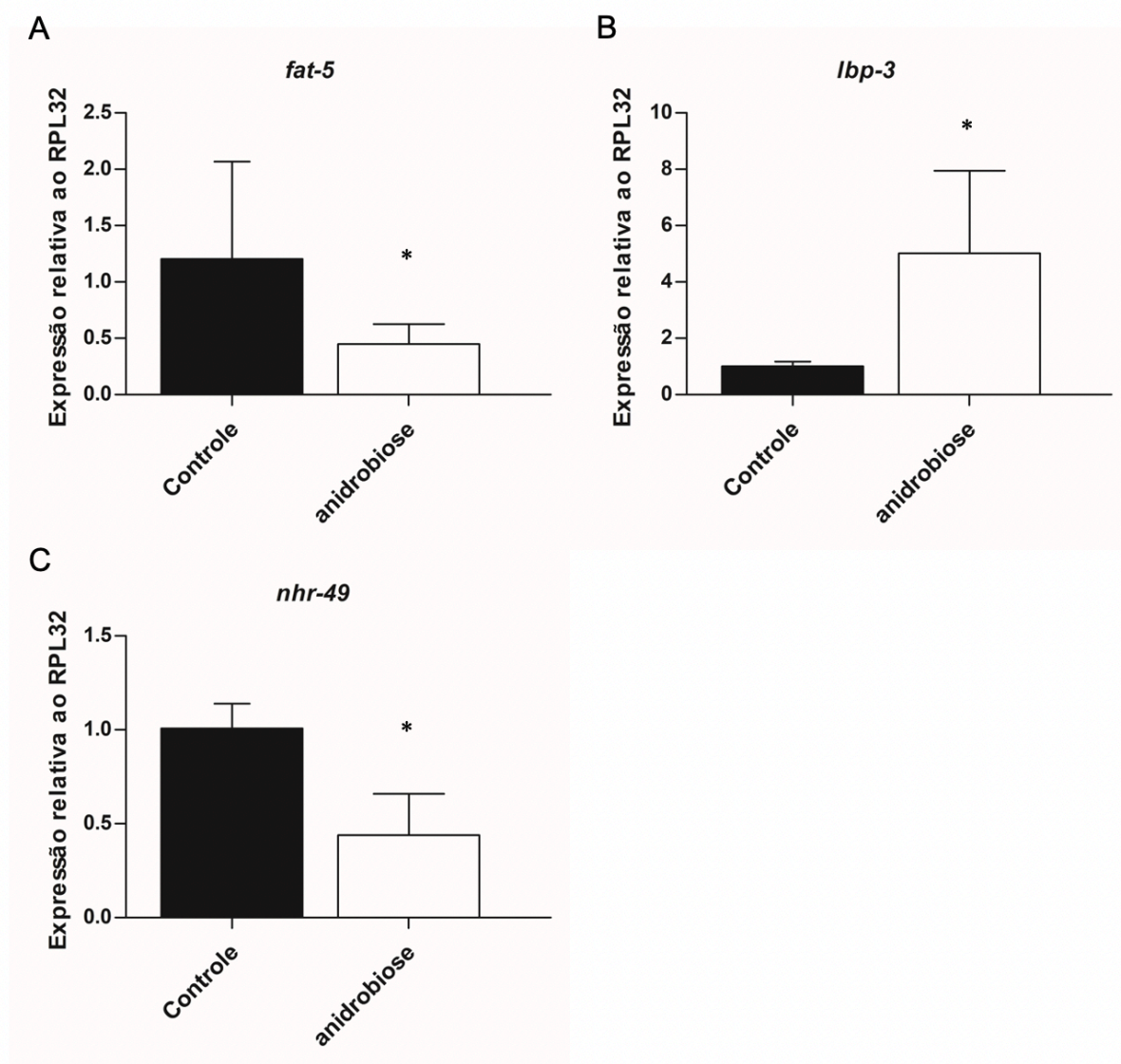


Figura 11. Expressão relativa dos genes *fat-5*, *lbp-3* e *nhr-49* em condição hidratada e em anidrobiose. A) Expressão relativa do gene *fat-5* ao gene *rpl32* [$t(16) = 2,565$; $p = 0,0207$]; B) Expressão relativa do gene *lbp-3* ao gene *rpl32* [$t(16) = 4,081$; $p = 0,0009$]; C) Expressão relativa do gene *nhr-49* ao gene *rpl32* [$t(16) = 6,642$; $p < 0,0001$]. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$.

4.4 Docking molecular de LBP-3 com ácido mirístico e linoleico

Após a observação do efeito da suplementação com ácidos graxos na anidrobiose e a identificação do gene *lbp-3* como sendo o que apresentou maior alteração no nível de expressão frente ao estresse da dessecação, foi realizada a predição da estrutura tridimensional de LBP-3 utilizando o programa AlphaFold 2, e em seguida o *docking* molecular, a fim de identificar potencial interação entre a proteína e os ligantes, as moléculas dos ácidos graxos utilizadas na suplementação.

Foi observado que LBP-3 pode se ligar com ambos os ácidos graxos, com afinidade teórica de ligação de -4,6 kcal/mol com ácido mirístico e -4,9 kcal/mol com o ácido linoleico. Além disso, as interações entre a proteína e os ligantes são interações de Van der Waals (mais prevalentes) e ligações de hidrogênio; esta última sendo os resíduos Tyr 65, Gln 147 e Arg 158 responsáveis pela interação com ácido mirístico, e Met 102 e Tyr 136 na interação com o ácido linoleico.

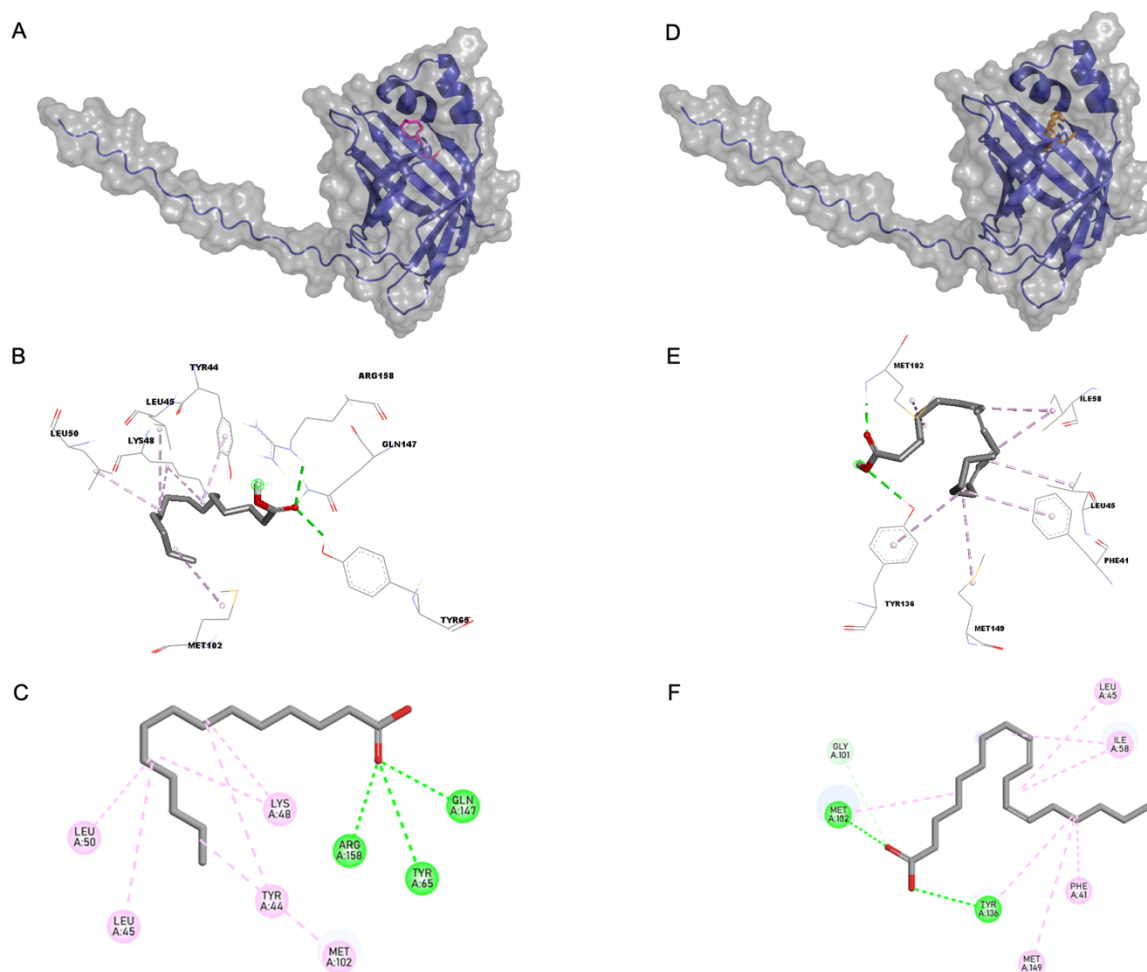


Figura 12. Interação de LBP-3 com ácidos graxos. A) Posicionamento da molécula de ácido mirístico (rosa) na estrutura de LBP-3; B) Representação 3D da interação entre proteína-ligante; C) Representação 2D da interação proteína-ligante; D) Posicionamento da molécula de ácido linoleico (laranja) na estrutura de LBP-3; E) Representação 3D da interação entre proteína-ligante; F) Representação 2D da interação proteína-ligante. Esferas em rosa representam interações de Van der Waals; Esferas em verde representam interações de hidrogênio.

4.5 Obtenção de sequências para construção do alinhamento múltiplo

Foram realizadas buscas utilizando-se as ferramentas blastp e tblastn para obtenção de sequências homólogas às LBPs de *C. elegans* (LBP-1 a LBP-9) em organismos não anidrobiontes e anidrobiontes, de modo que ao final foram obtidas um total de trinta e uma sequências para cada um dos grupos (Tabelas 3 e 4). Das sequências obtidas, é importante destacar que para as espécies não anidrobiontes foram obtidas as sequências em nível proteico, ou seja, as sequências primárias das proteínas. Por outro lado, para as espécies anidrobiontes, foi observado haver um número limitado de sequências primárias depositadas nos bancos de dados, mas grande disponibilidade de sequências em nível transcricional, assim, a maioria das sequências primárias das proteínas para esse grupo foram geradas utilizando a ferramenta ORFfinder a partir de fragmentos de cDNA (DNA complementar) do banco de dados de ESTs. É importante destacar que apesar das análises *in silico* focarem na proteína LBP-3, a busca foi realizada utilizando outros membros da família (LBP-1 a LBP-9 de *C. elegans*), pois LBP-3 se mostrou uma proteína exclusiva de nematoides, o que resultaria num pequeno número de sequências para a construção do alinhamento e análises (Apêndice I).

Tabela 3. Descrição das sequências obtidas para os organismos não anidrobiontes.

Filo	Espécie	Descrição	Acesso
Chordata	<i>Homo sapiens</i>	Crystal structure of human FABP4 in complex with a novel inhibitor	6LJX_A
	<i>Homo sapiens</i>	fatty acid-binding protein, heart isoform 2	NP_004093.1
	<i>Homo sapiens</i>	fatty acid-binding protein 5	NP_001435.1
	<i>Homo sapiens</i>	mammary-derived growth inhibitor	CAA71305.1
	<i>Homo sapiens</i>	Human myelin protein P2 mutant N2D	6XU5_A
	<i>Mus musculus</i>	fatty acid-binding protein, heart	NP_034304.1
	<i>Mus musculus</i>	Murine epidermal fatty acid-binding protein (FABP5), apo form, poly- his tag removed	4AZO_A
	<i>Mus musculus</i>	Toward changing specificity: adipocyte lipid binding protein mutant, oleic acid bound form	1G74_A
	<i>Danio rerio</i>	fatty acid-binding protein, heart	NP_694493.1
	<i>Danio rerio</i>	fatty acid binding protein 4a	NP_001004682.1
	<i>Danio rerio</i>	fatty acid binding protein 7, brain, a	NP_571680.1
	<i>Rattus norvegicus</i>	fatty acid-binding protein, heart	NP_077076.1
	<i>Rattus norvegicus</i>	retinol-binding protein 1	NP_036865.1
	<i>Rattus norvegicus</i>	adipocyte lipid-binding protein	AAD37371.1
	<i>Xenopus laevis</i>	hypothetical protein XELAEV_18012061mg	OCT94390.1
	<i>Xenopus laevis</i>	fatty acid binding protein 3 S homeolog	NP_001085576.1
	<i>Xenopus laevis</i>	peripheral myelin protein 2 S homeolog	NP_001087276.1
	<i>Branchiostoma floridae</i>	fatty acid-binding protein, brain-like	XP_035659742.1
	<i>Branchiostoma floridae</i>	sodium/calcium exchanger regulatory protein 1-like	XP_035660104.1
	Arthropoda	<i>Drosophila melanogaster</i>	fatty acid binding protein, isoform B
<i>Drosophila melanogaster</i>		SD12036p	AAN71654.1
Nematoda	<i>Pristionchus pacificus</i>	lbp-6	KAF8366920.1
	<i>Pristionchus pacificus</i>	lbp-3	KAF8375376.1
	<i>Pristionchus pacificus</i>	lbp-9	KAF8383068.1
	<i>Pristionchus pacificus</i>	lbp-1	KAF8384924.1
Rotifera	<i>Rotaria magnacalcarata</i>	unnamed protein product	CAF1270838.1
	<i>Rotaria magnacalcarata</i>	unnamed protein product	CAF1270804.1
	<i>Rotaria magnacalcarata</i>	unnamed protein product	CAF1482286.1
	<i>Rotaria magnacalcarata</i>	unnamed protein product	CAF1099585.1
Placozoa	<i>Trichoplax adhaerens</i>	hypothetical protein TRIADDRAFT_59086	XP_002115178.1
	<i>Trichoplax adhaerens</i>	expressed hypothetical protein	XP_002115009.1

Os dados estão apresentados como: filo, espécie a qual pertence a sequência, descrição com o nome da sequência e o número de acesso no NCBI. Para melhor visualização do filo ao qual pertence cada sequência, foi adicionado padrões de cores; Chordata: azul; Arthropoda: amarelo; Nematoda: laranja; Rotifera: verde; Placozoa: cinza.

Tabela 4. Descrição das sequências obtidas para os organismos anidrobiontes.

Filo	Espécie	Descrição	Acesso
Arthropoda	<i>Artemia Franciscana</i>	BIG_AF_576 Brine Shrimp Adult cDNA 5', mRNA sequence	ES492760.1
	<i>Polypedilum vanderplanki</i>	FS597869 pvD00 cDNA clone E_ET_PVD00_09G20_F_0 5', mRNA sequence	FS597869.1
	<i>Polypedilum vanderplanki</i>	FS596529 pvD00 cDNA clone E_ET_PVD00_05C21_F_0 5', mRNA sequence	FS596529.1
	<i>Polypedilum vanderplanki</i>	FS598464 pvD00 cDNA clone E_ET_PVD00_11F22_F_0 5', mRNA sequence	FS598464.1
Tardigrada	<i>Hypsibius dujardini</i>	Putative Fatty acid-binding protein, adipocyte	OQV13925.1
	<i>Hypsibius dujardini</i>	Putative Cellular retinoic acid-binding protein 2	OQV13472.1
	<i>Hypsibius dujardini</i>	Putative Fatty acid-binding protein, heart	OQV19091.1
	<i>Hypsibius dujardini</i>	Putative Cellular retinoic acid-binding protein 1	OQV22369.1
	<i>Ramazzottius varieornatus</i>	FABP2	GAU88111.1
	<i>Ramazzottius varieornatus</i>	FABP5	GAV05213.1
Nematoda	<i>Ramazzottius varieornatus</i>	FABP6	GAV01858.1
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	LBP-1	NP_508557.1
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	LBP-2	NP_508558.1
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	LBP-3	NP_001379901.1
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	LBP-4	CCD65781.1
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	LBP-5	CCD68990.1
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	LBP-6	CCD68988.1
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	LBP-7	CAB03387.1
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	LBP-8	CAB03391.2
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	LBP-9	NP_001033511.1
	<i>Panagrolaimus superbus</i>	Genome assembly, contig: PSU_contig_17508, whole genome shotgun sequence	CABFKN010009087.1
	<i>Panagrolaimus superbus</i>	Genome assembly, contig: PSU_contig_11870, whole genome shotgun sequence	CABFKN010005125.1
	<i>Panagrolaimus superbus</i>	Ps_Lib1E_36DG02_PSC00876 Unstressed mixed stage	GW406630.1
	<i>Panagrolaimus superbus</i>	Ps_Lib1E_32DB08_PSC00220 Unstressed mixed stage	GW408206.1
<i>Plectus murrayi</i>	PL_EST_PL637 desiccated cDNA library <i>Plectus murrayi</i> cDNA 5', mRNA sequence	FG619536.1	
Rotifera	<i>Adineta ricciae</i>	Unnamed protein product	CAF0838768.1
	<i>Adineta ricciae</i>	Unnamed protein product	CAF0838730.1
	<i>Adineta ricciae</i>	Unnamed protein product	CAF1212134.1
	<i>Adineta ricciae</i>	Unnamed protein product	CAF1212151.1
	<i>Adineta ricciae</i>	Unnamed protein product	CAF1106252.1
	<i>Philodina roseola</i>	cDNA clone Pr_hyd_19G02 5' similar to Q61CY2_CAEBR Hypothetical protein CBG12714	DY523190.1

Os dados estão apresentados como: filo, espécie ao qual pertence a sequência, descrição com o nome da sequência e o número de acesso no NCBI. Para melhor visualização do filo a qual pertence cada sequência, foi adicionado padrões de cores; Arthropoda: amarelo; Tardigrada: roxo; Nematoda: laranja; Rotífera: verde.

4.6 Alinhamento múltiplo entre membros da família das FABPs

Após a obtenção das sequências primárias das proteínas para as espécies de ambos os grupos, foi realizado o alinhamento múltiplo dessas sequências utilizando a ferramenta Muscle e a visualização utilizando o programa Jalview (Figura 13). Para a visualização foi considerado nível de identidade de 50% dentro de cada grupo, a fim de identificar as posições mais e menos conservadas entre as FABPs de espécies não anidrobiontes e anidrobiontes – tais posições encontram-se destacadas em azul, sendo a conservação de um determinado aminoácido em uma dada posição determinado pela intensidade da cor; tom de coloração mais intenso significa conservação mais próximo do 100% entre as espécies do grupo e tom menos intenso mais próximo de 50% de identidade. Foi observado que entre os não anidrobiontes em 75 posições um determinado aminoácido apresentava conservação por identidade de pelo menos 50% entre as FABPs, e considerando o tamanho médio (139 aminoácidos) das sequências, representa que 54% da proteína ou aproximadamente metade dos aminoácidos das FABPs para esse grupo apresentam pelo menos moderada conservação. Já entre os anidrobiontes, 49 posições apresentavam um aminoácido conservado em pelo menos 50% das sequências, representando que apenas 35% ou aproximadamente um terço dos aminoácidos das FABPs desse grupo apresentam pelo menos moderada conservação.

Posteriormente, focando especificamente nos aminoácidos divergentes entre os grupos, foi utilizado como estratégia na identificação dos mesmos considerar as posições que um dado aminoácido além de se apresentar 50% conservado para o grupo, também apresentava pelo menos o dobro de ocorrências em relação ao outro grupo, representando uma razão $\geq 2,0$. As posições que apresentam tais aminoácidos foram destacadas pelos retângulos vermelhos (Figura 13) e as razões estão apresentadas no Apêndice L. Foi observado que os organismos não anidrobiontes apresentam dez posições com aminoácidos mais conservados em relação ao grupo anidrobionte, enquanto que o grupo anidrobionte apresenta quatro posições com aminoácidos mais conservados em relação ao grupo não anidrobionte.

Adicionalmente, buscando caracterizar os resíduos divergentes entre os grupos, foi realizado uma revisão de literatura buscando por artigos que apresentavam aminoácidos com funções estruturais para as FABPs de diferentes espécies (Tabela 8; Apêndice O). Tais posições foram identificadas no alinhamento (Figura 13) por meio

de triângulos vermelhos. Foi observado que três posições apresentavam algum aminoácido com função descrita na literatura (posições 44 e 49), sendo um deles para o grupo anidrobionte (posição 105).

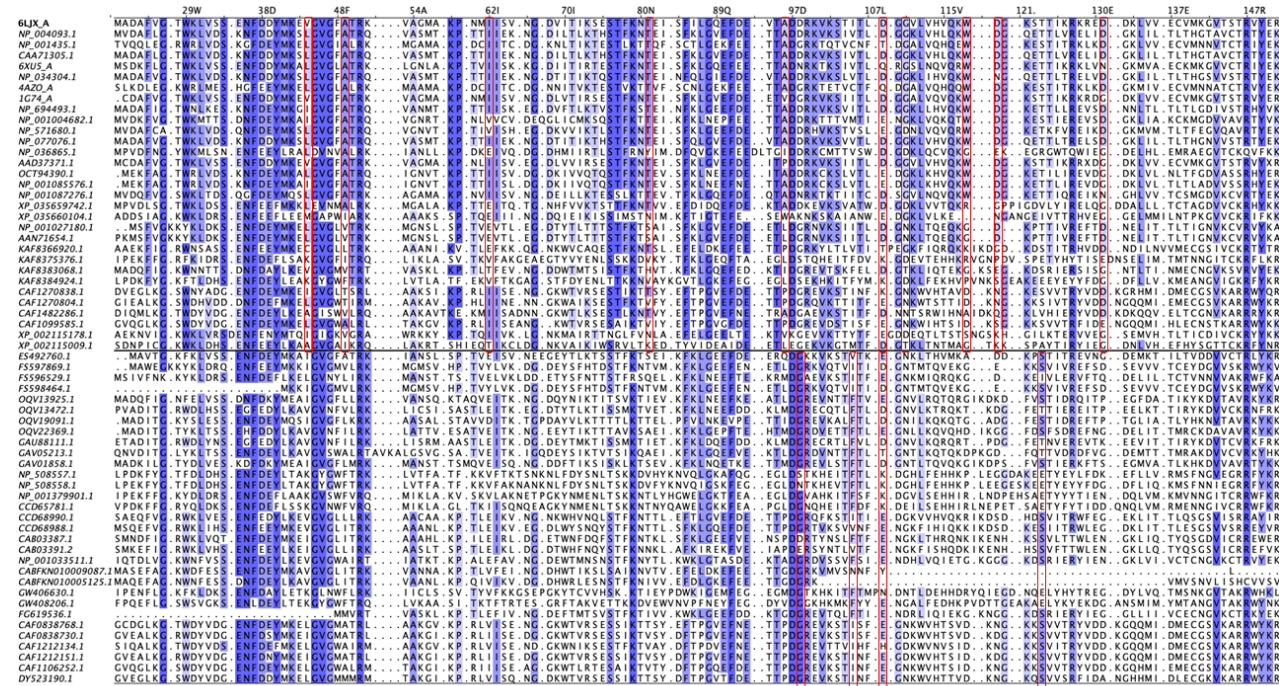


Figura 13. Alinhamento e conservação por identidade das sequências primárias das FABPs de organismos não anidrobiontes e anidrobiontes. Visualização das sequências alinhadas com a ferramenta Muscle e demonstradas utilizando o programa Jalview. A coloração dos aminoácidos foi realizada utilizando como parâmetro 50% de identidade dentro do grupo (não anidrobionte ou anidrobionte) por meio da opção “percentage with a gap”. Destacados por meio de retângulos vermelhos encontram-se as posições na qual um determinado aminoácido apresenta frequência de ocorrência como sendo de pelo menos o dobro (razão $\geq 2,0$) em relação ao outro grupo. Identificados por triângulos vermelhos encontram-se as posições nas quais a frequência de um dado aminoácido é de pelo menos o dobro em relação ao outro grupo e estudos na literatura atribuem alguma função específica para um aminoácido de mesma posição para uma proteína da família das FABPs.

4.7 Análises estruturais

Uma vez que foram verificadas as diferenças entre os grupos a nível de sequência primária das FABPs, foi buscado caracterizar estruturalmente LBP-3 de *P. superbis* e analisar o potencial papel estrutural dos resíduos ocupando as posições diferentemente conservadas entre os grupos e com função descrita na literatura (indicados pelos triângulos vermelhos no alinhamento). Dessa forma, para a caracterização estrutural de LBP-3 de *P. superbis* foi utilizado a ferramenta DALI, que identifica em banco de dados estruturais quais estruturas são mais semelhantes entre si. Tal estratégia foi utilizada pelo fato de as proteínas da família não apresentarem alta conservação de sequência primária. Dentre as diversas estruturas encontradas na busca, a que mais se assemelhou estruturalmente foi 4A1H – proteína P2 da mielina (PMP2/FABP8).

Por meio do programa PyMOL foi realizada a sobreposição entre as estruturas, e o valor de RMSD obtido (2,029 Å; LBP-3 vs 4A1H) (Figura 14), indicando que as estruturas são conservadas estruturalmente ($\leq 2,5$ Å). No entanto, foi observado que as regiões das duas α -hélices e N-terminal, esta última mais extensa e não enovelada em LBP-3, apresentavam-se diferentes entre as estruturas.



Figura 14. Sobreposição das estruturas. Sobreposição das estruturas de LBP3 (azul) e FABP8 (4A1H - cinza). RMSD = 2,029 Å.

Após a identificação da FABP com estrutura mais semelhante a LBP-3 de *P. superbus*, foi buscado caracterizar estruturalmente os resíduos nas posições diferentemente conservadas entre os grupos (indicados pelos triângulos vermelhos). As diferenças identificadas nas posições 44 e 49 (descritos na Tabela 8; Apêndice L) como estando relacionadas com FABPs como sendo do tipo “colisional” (realiza contato direto com fosfolipídios de membrana para liberar ou captar ácidos graxos) ou FABPs que realizam o transporte por meio de mecanismos difusão; das quais, FABPs com resíduos positivamente carregados nessa região são do tipo “colisional” (Tillman *et al.*, 2019). Além disso, aminoácidos também localizados nas regiões das α -hélices compõem um sinal de localização nuclear (SLN), característico de algumas proteínas da família das FABPs, composto por dois resíduos de lisina (K) e uma arginina (R). Foi observado que LBP-3 apresenta resíduos de aminoácidos carregados positivamente na proximidade das posições 44 e 49 (Figura 15A). No entanto, não foi observada a presença do SLN como pode ser observada em outras FABPs (Figura 15B).

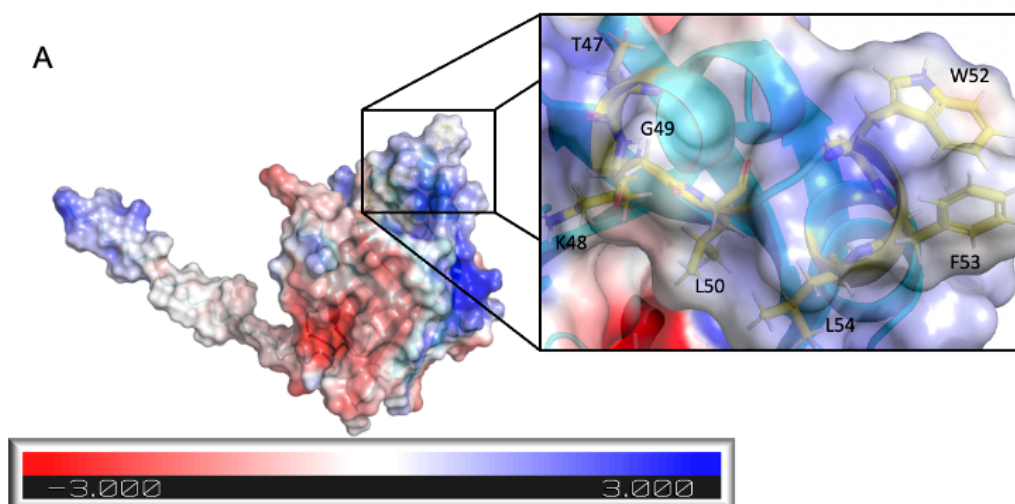


Figura 15. Caracterização da região das α -hélices em LBP-3. A) Representação da carga de superfície de LBP-3 com foco na região das α -hélices. Azul: carga positiva; vermelho: Carga negativa; B) Identificação da presença do SLN (aminoácidos destacados em laranja) em FABPs de *H. sapiens* e ausência do sinal em LBP-3 de *P. superbis*.

Uma vez que foi observado que LBP-3 não apresenta o clássico SLN visto em outras FABPs, foram realizadas análises adicionais de modo a prever o endereçamento da proteína. Assim, utilizando a ferramenta SignalP foi identificado que os primeiros 21 resíduos adicionais observados na porção N-terminal da proteína correspondem a sequência de um peptídeo sinal (Figura 16A). E utilizando a ferramenta LocTree foi predito (acurácia de 87%) que LBP-3, diferentemente das outras FABPs, é secretada para fora da célula (Figura 16B).

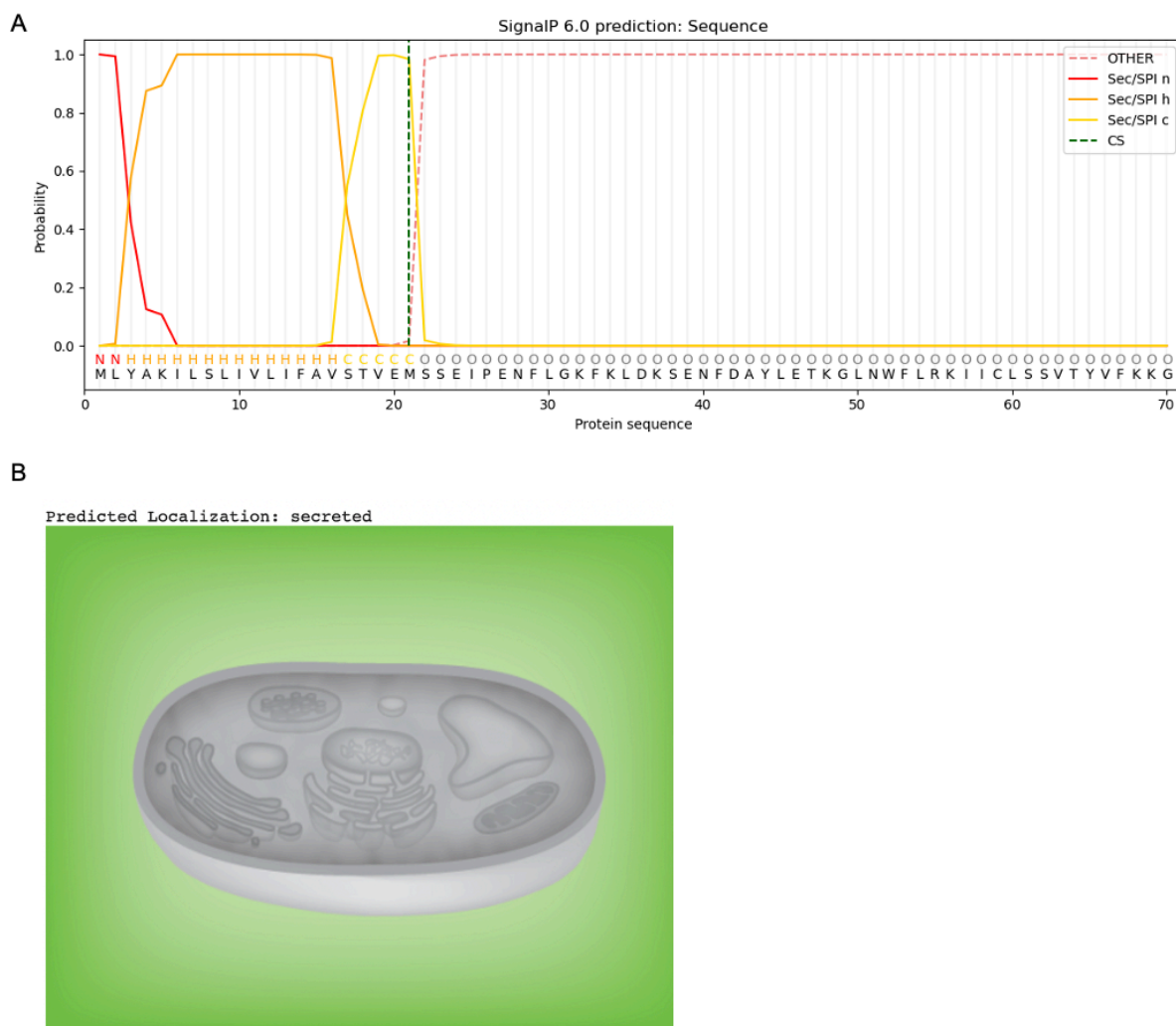


Figura 16-Predição da localização de LBP-3. A) Sequência sinal e sítio de clivagem (CS) preditos com a ferramenta signalP 6.0 em LBP-3 de *P. superbis*. B) A área colorida em verde indica a localização da proteína - secretada para fora da célula.

Por fim, a terceira posição que se apresentou diferente entre as FABPs foi a posição 105, a qual apresenta o resíduo cisteína em algumas FABPs. De acordo com Gutierrez-Gonzalez et al, FABPs apresentam até seis resíduos de cisteína ao longo de sua sequência com algumas formando pontes de sulfeto. No entanto, LBP-3 apenas apresenta dois resíduos de cisteína na sequência, e a predição da formação de pontes de sulfeto realizada com a ferramenta DiANNA indicou um baixo potencial da formação de uma ponte de sulfeto entre os resíduos Cys 59 e 78 (Tabela 9; Apêndice P). Adicionalmente, no mesmo estudo, os autores atribuem maior estabilidade estrutural às FABPs com composição hidrofóbica dos aminoácidos que compõem o “fundo” da estrutura do barril beta (posições 25, 83, 85, 105 e 107 no alinhamento – Figura 13. Entretanto, foi observado que em LBP-3 de *P. superbus* os resíduos que compõem o “fundo” da estrutura formam um conjunto mais hidrofílico que o visto em FABPs de organismos não anidrobiontes (Figura 15A; Figura 17).

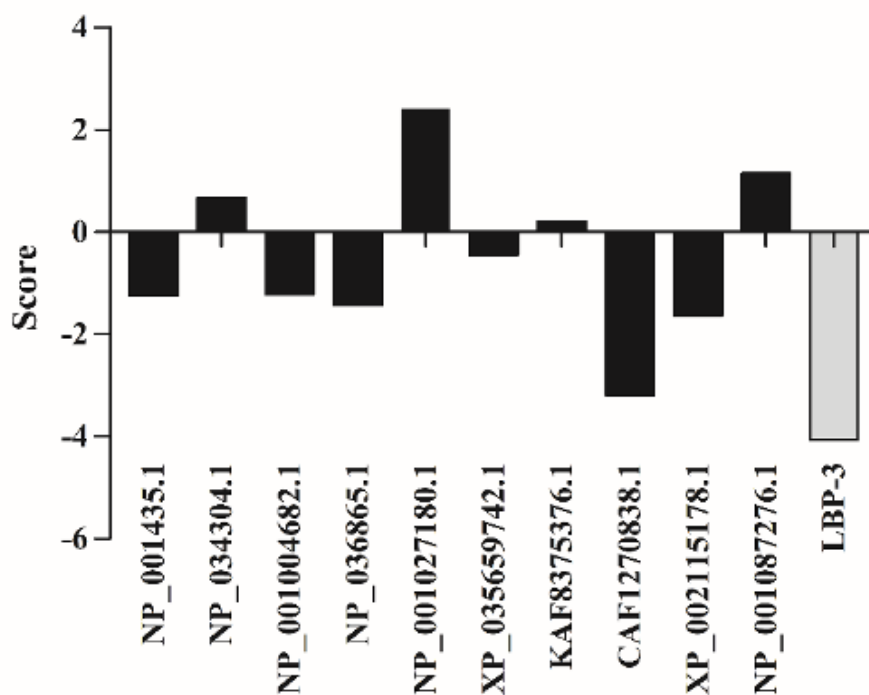


Figura 17. Valores de hidropaticidade de diferentes FABPs. Nível de hidrofobicidade dos resíduos que compõem o fundo da estrutura de barril beta de LBP-3 de *P. superbus* e FABPs de organismos não anidrobiontes. Barras em preto indicam FABPs de organismos não anidrobiontes; Barra em cinza indica LBP-3 de *P. superbus*. Score positivo indica característica hidrofóbica; Score negativo indica característica hidrofílica.

Discussão

5. Discussão

No presente estudo foi demonstrado que a alteração na proporção de ácido graxo poli-insaturado proveniente da alimentação interfere na anidrobiose e na fertilidade do nematoide *P. superbus*. Também, que os genes *fat-5*, *nhr-49* e *lbp-3*, envolvidos com o metabolismo de ácidos graxos, estão associados com a anidrobiose, sendo *lbp-3* o que apresentou maior alteração na expressão mediante desafio da dessecação – sugerindo maior importância no processo entre os três genes estudados. Por fim, as análises *in silico* mostraram que LBP-3 é capaz de interagir tanto com ácidos graxos saturados como com poli-insaturados, é uma proteína exclusiva de nematoides, como também, apresenta uma cauda distinta de aminoácidos na porção N-terminal, não observada em outras FABPs, que representa um sinal de exportação celular; possui diferentes orientações para suas α -hélices e uma estrutura de barril beta mais hidrofílica em sua porção inferior.

Alguns estudos reportaram que no período que precede a entrada em anidrobiose, para diferentes espécies, ocorre o aumento da acumulação de ácidos graxos insaturados/poli-insaturados no metabolismo. E tal aumento está associado com uma maior taxa de mortalidade à medida que se prolonga o tempo no estado anidrobiótico (Selvan *et al.*, 1993; Rizzo *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2020). De acordo com Oku *et al.* (2003), as insaturações presentes nas moléculas de ácidos graxos insaturados/poli-insaturados apresentam maior propensão a sofrerem ataques por radicais livres, que por sua vez pode levar a oxidação/degradação de tais moléculas, e consequentemente danos em estruturas contendo ácidos graxos em sua composição, como por exemplo, membranas. O acúmulo de ácidos graxos insaturados/poli-insaturados durante o desafio da dessecação foi demonstrado molecularmente por Erkut *et al.* (2013), o qual reportou a indução da via das dessaturases de ácidos graxo no nematoide *C. elegans*. No entanto, este não deve ser o principal fator relacionado ao aumento da mortalidade pós-reidratação observado nos resultados (Figura 1A/B), uma vez que as amostras foram preservadas no estado anidrobiótico por um curto período de tempo - apenas uma semana.

De acordo com (Wright, 1989a), a permeabilidade da cutícula em tardígrados é reduzida durante a entrada em anidrobiose, na tentativa de reter água, isto é, perder água mais lentamente durante a dessecação; a quantidade de água retida está relacionada ao sucesso anidrobiótico. Além disso, o mesmo autor também reportou

que lipídios na camada intracuticular são as moléculas responsáveis por regular a perda de água formando uma “barreira”, e a incorporação de ácidos graxos saturados está relacionada a maior impermeabilidade da barreira, enquanto que a incorporação de ácidos graxos insaturados/poli-insaturados aumenta a permeabilidade da mesma (Wright, 1989b). De forma semelhante, no nematoide *Ditylenchus dipsaci*, de acordo com (Wharton *et al.*, 2008), a retenção de água durante a dessecação possivelmente é regulada através do acúmulo de lipídios externamente na cutícula, de modo a formar uma camada extra. Baseado em tais modelos e nos resultados obtidos, é possível que o aumento da disponibilidade de ácido linoleico na alimentação do *P. superbus* forneça um aumento significativo em ácidos graxos poli-insaturados, acima do que é normalmente observado em organismos anidrobiontes durante a entrada em anidrobiose. Assim, resultando na formação de uma camada extra cuticular mais permeável (rica em ácidos graxos poli-insaturados), interferindo na retenção de água durante a dessecação, e levando na diminuição da viabilidade.

Curiosamente, a queda na viabilidade só foi observada na suplementação a curto prazo (3 dias) - não foi possível chegar a uma conclusão a respeito do motivo de a suplementação por maior período de tempo (10 dias) não afetar significativamente na anidrobiose, mas a principal hipótese é a de que devido a alta instabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados, a exposição ao ar, temperatura e luz durante o período de dez dias de experimentação pode ter levado a oxidação e outras modificações químicas no ácido linoleico (Lytle *et al.*, 1992); reforçado pelo curto período de exposição utilizado em experimentos de suplementação de nematoides com ácidos graxos (Horikawa e Sakamoto, 2009; Deline *et al.*, 2013) ou passagem dos animais para placas novas após curtos períodos de exposição (O'rourke *et al.*, 2013). Adicionalmente, a suplementação com ácido mirístico também não afetou na anidrobiose do *P. superbus*, possivelmente por se tratar de uma espécie que atinge o estado anidrobiótico com bastante eficiência, isto é, atinge uma viabilidade próxima de 100% frente o desafio da dessecação (Shannon *et al.*, 2005); assim, não havendo melhora na retenção de água promovido pelo predomínio de ácidos graxos saturados na camada extra cuticular além da já eficientemente promovida pela fisiologia natural da espécie. E por fim, apesar da modesta diminuição na viabilidade observada, é importante destacar que o resultado é similar ao observado ao realizar o silenciamento individual de genes relacionados a anidrobiose (Evangelista *et al.*, 2017).

Durante a realização dos ensaios de suplementação, foi observado a diminuição do tamanho populacional, assim, foi verificado o crescimento populacional do *P. superbus* após 20 dias em placas suplementadas com ácido linoleico; o grupo controle apresentou crescimento de aproximadamente 5 vezes, enquanto que para o grupo suplementado não houve alteração no tamanho populacional (Figura 10A). De acordo com Watts e Browse (2006), a suplementação do nematoide *C. elegans* com ácido Dihomo-Gama-Linolenico (DGLA) leva a infertilidade nos animais pela morte das células germinativas, à medida que outros ácidos graxos de cadeia longa com propriedades semelhantes não apresentam efeito na infertilidade, incluindo o ácido linoleico.

Além disso, os autores observaram que o efeito do DGLA é dependente da atividade da via das dessaturases e elongases, isto é, parece ser dependente da conversão de DGLA em outros produtos. Similarmente, Webster *et al.* (2013) também demonstrou que a suplementação com DGLA leva a infertilidade em *C. elegans*, mas curiosamente, linhagens mutantes para genes relacionados a sensibilidade de nutrientes, como por exemplo, *daf-2* (relacionados a resistência ao estresse e a anidrobiose) reduzem o efeito da infertilidade causado pela exposição ao DGLA. Os genes relacionados a infertilidade reportados por ambos os trabalhos, pela relação das vias metabólicas das quais fazem parte com a anidrobiose, potencialmente podem sugerir uma possível relação entre fertilidade e anidrobiose.

Adicionalmente, foi testado se a anidrobiose seria capaz de reverter a infertilidade nos animais e foi observado que não. O processo anidrobiótico parece desencadear eventos regulatórios, como por exemplo, regulação epigenética e por RNAs não codificantes (Storey, 2015; Deviatiiarov *et al.*, 2020). Estes, que por sua vez, levantam a hipótese de estarem associados ao ganho reprodutivo (fecundidade) observado na espécie de rotífero *Adineta ricciae* quando comparado a exemplares de mesma espécie que não passaram pelo desafio da dessecação ou ao declínio do *fitness* observado em rotíferos que se mantem hidratados por várias gerações, sugerindo que a espécie se beneficia do processo anidrobiótico (Ricci e Caprioli, 2005).

Além disso, a anidrobiose também parece estar relacionada ao aumento da atividade de vias de reparo ao dano ao DNA (Gusev *et al.*, 2010). No entanto, observamos uma limitada capacidade de reparo, isto é, a não reversão do fenótipo de infertilidade e conseqüentemente crescimento populacional. Tal achado é semelhante

ao relatado por Welnicz *et al.* (2011), o qual reportou que a anidrobiose não é capaz de reparar danos em estruturas celulares causados por radicais livres, como por exemplo, os associados a suplementação com DGLA (Watts e Browse, 2006).

A respeito da relação de genes da metabolização de ácidos graxos com a anidrobiose, foi identificado que os três genes, *fat-5*, *nhr-49* e *lbp-3*, alteraram significativamente o nível de expressão gênica mediante o desafio da dessecação. De acordo com Tyson *et al.* (2007), em células hidratadas os lipídios de membrana encontram-se no estado de cristal líquido e a dessecação resulta na compactação das moléculas de fosfolipídios, levando a uma alteração de fase em sentido da fase de “gel”, que por sua vez pode acarretar a danos na integridade das membranas; e na tentativa de preservar tais estruturas a célula introduz insaturações nos ácidos graxos de membrana. Curiosamente, FAT-5, é uma $\Delta 9$ dessaturase que catalisa a inserção de insaturação no ácido palmítico (16:0) para a síntese do ácido palmitoleico (16:1) e no ácido esteárico (18:0) para a síntese do ácido oleico (18:1) (Brock *et al.*, 2007; Erkut *et al.*, 2013), apresentou redução em aproximadamente metade no nível de expressão durante a dessecação.

Em *C. elegans*, uma linhagem mutante para o gene *fat-5* se mostrou bastante sensível ao desafio da dessecação (baixa viabilidade), assim como linhagens mutantes para outras dessaturases de ácidos graxos (*fat-3*, *fat-4*, *fat-6* e *fat-7*), sugerindo a via das dessaturases e consequentemente ácidos graxos estarem envolvidos com o sucesso anidrobiótico em *C. elegans* (Erkut *et al.*, 2013). Semelhantemente, (Tyson *et al.*, 2007; Yaari *et al.*, 2016) também demonstraram o aumento da expressão de transcritos com similaridade a dessaturases frente ao estresse hídrico nos nematoides entomopatogênicos *Steinernema carpocapsae* e *Steinernema spp*, respectivamente.

Por outro lado, em um estudo, realizado por (Sinclair *et al.*, 2007) utilizando a mosca *Drosophila melanogaster* foi observado redução no nível de expressão gênica da dessaturase 2, uma $\Delta 9$ dessaturase, frente ao estresse hídrico; que de acordo com os autores estaria envolvida no processo de formação de hidrocarbonetos da cutícula protegendo contra perda de água. No entanto, *D. melanogaster* não é um animal anidrobionte e os autores não apresentam informações detalhadas sobre a intensidade do estresse hídrico utilizado. Adicionalmente, é importante destacar os nematoides utilizados nos estudos apresentados necessitam de vários dias de pré-condicionamento, não sendo organismos eficientemente tolerantes a dessecação

extrema (Grewal, 2000; Wharton, 2011). Por fim, esses mesmos nematoides apenas são resistentes a dessecação durante o estágio alternativo de desenvolvimento conhecido como *dauer*, que por sua vez é atingindo através de agentes estressores: densidade populacional, disponibilidade de alimento e temperatura (Tyson *et al.*, 2007; Hu, 2018). Tais características podem interferir na identificação de genes, como também representar diferentes mecanismos de resistência ao estresse hídrico.

Receptores hormonais nucleares, como *nhr-49* são conhecidos por regular a expressão gênica das $\Delta 9$ dessaturases mantendo o balanço entre ácidos graxos saturados e monoinsaturados (Savory *et al.*, 2011); de modo que a redução no nível de expressão gênica observada para *fat-5* e *nhr-49* parece estar diretamente relacionada. De acordo com Van Gilst, Hadjivassiliou, Jolly, *et al.* (2005) a deleção do gene *nhr-49* em *C. elegans* leva a redução na longevidade e aumento do acúmulo de gordura nos animais, este último, por sua vez, devido ao papel de *nhr-49* na promoção da quebra de ácidos graxos nas mitocôndrias, que então por meio do controle da β -oxidação influencia no armazenamento de gordura. Relacionado a outros membros da família dos NHRs, *nhr-8* e *dhr96* estão associados a regulação da detoxificação contra estressores xenobióticos ambientais em *C. elegans* e *D. melanogaster*, respectivamente (Hoffmann e Partridge, 2015). No contexto anidrobiótico, (Fu *et al.*, 2020) analisando o transcriptoma do nematoide foliar *Aphelenchoides fragariae* observou que 30% dos genes pertencentes a família dos NHRs apresentava aumento da expressão gênica em resposta a dessecação.

Diferentemente dos outros genes estudados, *lbp-3* apresentou aumento no nível de expressão gênica durante a entrada em anidrobiose. No estudo realizado por (Erkut *et al.*, 2013), analisando a expressão de genes por microarranjos em *C. elegans* frente a resposta a dessecação identificou o aumento da expressão de genes pertencentes a família das FABPs, como, *lbp-2*, *lbp-5*, *lbp-6*, *lbp-8*, *lbp9*, entre outros, mas não observou para *lbp-3*. Como mencionado anteriormente, os lipídios na cutícula formam uma barreira protetora contra a perda de água frente a dessecação; nesse sentido, Njume *et al.* (2022) estudando como os lipídios na cutícula de nematoides contribuem para a permeabilidade da barreira, identificou GMAP-1, uma proteína também ligante a lipídios, como sendo crucial para a formação e organização dos lipídios na cutícula para formação da barreira, e a deleção do gene levava a uma baixa taxa de sobrevivência frente ao estresse ao meio hipotônico. Em tardígrados, análises

do transcriptoma da espécie *Milnesium tardigradum* também revelam que dentre os transcritos relacionados a lipídios, os mais abundantes são representados por FABPs.

Segundo as evidências apresentadas, o metabolismo lipídico parece apresentar uma importante relação com a anidrobiose. No entanto, estudos a respeito de genes envolvidos em vias associadas são bastante limitados, de tal forma que este é o primeiro trabalho relacionando os genes *fat-5*, *nhr-49* e *lbp-3* ao mesmo tempo com a anidrobiose. Diferentemente de outros organismos estudados na literatura, *P. superbus* parece apresentar características particulares quanto sua anidrobiose; assim, uma hipótese que foi levantada a respeito da relação dos três genes durante a dessecação é de que a diminuição na expressão de *fat-5* e *nhr-49* está relacionada a diminuição da síntese de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados (associados a maior permeabilidade a perda de água através da barreira lipídica) e para o acúmulo de lipídios utilizados como fonte energética durante a animação suspensa, por sua vez, *lbp-3* tem expressão aumentada para o direcionamento de ácidos graxos para a barreira lipídica na cutícula.

Referente às análises *in silico*, inicialmente foi observado a capacidade de LBP-3 de se ligar aos ácidos graxos utilizados nos experimentos de suplementação. Em geral, ácidos graxos saturados apresentam uma conformação linear na cavidade das FABPs, enquanto ácidos graxos insaturados adquirem conformação em formato de “U”, sendo os resíduos que realizam as interações de hidrogênio os responsáveis pelo posicionamento dos ácidos graxos no interior da cavidade (Furuhashi e Hotamisligil, 2008; De Toledo-Silva *et al.*, 2017).

De Toledo-Silva *et al.* (2017) reportou que FABPs de vertebrados interagem com seus ligantes por meio de pelo menos um resíduo do motivo Arg/X/Tyr localizado na folha β 10 da porção C-terminal da proteína. Por outro lado, Tillman *et al.* (2019) demonstrou que LBP-8 de *C. elegans* não apresenta o motivo Arg/X/Tyr, e que na ausência da Tyr geralmente é observado a interação com o ligante por meio da Arg na posição 112, mas que esta também é ausente em LBP-8. Dessa forma, os resultados do estudo demonstraram que a estabilização do grupo carboxila do ligante é mediada por meio dos resíduos Gln 121, Tyr 123 e Arg 132. Foi observado que LBP-3 de *P. superbus* não apresenta o motivo Arg/X/Tyr, mas realiza interações de hidrogênio com o ligante por meio da Arg 158 da folha β 10 com o ácido mirístico e por meio da Tyr 136 da folha β 8 com o ácido linoleico. E para compensar a ausência

do motivo em sua sequência primária, LBP-3 também realiza interações de hidrogênio por meio da Tyr 65 e Gln 147 com o ácido mirístico, e Met 102 com o ácido linoleico. Apesar das diferenças nos resíduos realizando interações de hidrogênio com os ácidos graxos, a energia teórica de afinidade se mostrou próxima entre os ligantes. Similar ao observado para FABP5 na interação com diferentes ácidos graxos, incluindo mirístico e linoleico [(14:0 -5,7 Kcal/mol); (18:2 -5,9 Kcal/mol)] (Earlia *et al.*, 2019).

Posteriormente, foi identificada diferenças na conservação dos aminoácidos da estrutura primária das FABPs entre o grupo não anidrobionte e anidrobionte. De acordo com Smathers e Petersen (2011), as FABPs apresentam baixo grau de conservação com relação às sequências primárias. Este dado é semelhante aos nossos resultados observados, no qual foi demonstrado que entre os não anidrobiontes as FABPs apresentavam pelo menos 50% de conservação em aproximadamente metade das sequências, enquanto que para os anidrobiontes em aproximadamente um terço da sequência – sugerindo que as FABPs de anidrobiontes são menos conservadas que as dos não anidrobiontes.

É sugerido que duplicação e divergência de um gene ancestral comum explique a homologia entre as FABPs. Assim, elas pertencem a uma grande família (iLBPs – proteínas ligantes de lipídio intracelular), que por sua vez pode ser dividida em subfamílias (Smathers e Petersen, 2011). Uma dessas subfamílias é a IV, sendo característico entre seus membros a presença de Arg na posição 106 e 126, uma Tyr na posição 128 e uma Phe na posição 57 que se mostram como importantes na interação com o ligante. Além disso, também característicos dos membros dessa subfamília são a presença de um SLN composto por Lys 24, Lys 34 e Arg 33 em FABP5 (Armstrong *et al.*, 2014), um sinal de exportação nuclear (SEN) composto por Leu 67, Leu 87 e Leu 92 em FABP4 (Ayers *et al.*, 2007), um sítio de ligação a hormônio sensível à lipase (HSL) em FABP4 (Lys 21), e uma Phe 57 que regula a conformação da região do portal (Furuhashi e Hotamisligil, 2008). Tais aminoácidos parecem se mostrar conservados para a maioria das sequências analisadas entre as espécies para ambos os grupos – posições no alinhamento SLN (42, 52 e 51); SEN (88, 108, 113); HSL (42); regulação do portal (78).

Não foram encontrados estudos verificando especificamente a conservação de sequência primária de FABPs entre espécies anidrobiontes, mas (Fukuda *et al.*, 2017) estudando a família de proteínas solúvel em calor, secretória e abundante (SAHS),

importante durante o processo de anidrobiose em tardígrados, e que é similar estruturalmente e no papel de ligação aos ácidos graxos às FABPs, demonstrou a conservação dos resíduos de Tyr 163 (149) e Arg 161 (147) no sítio de interação ao ligante, como também, a conservação de uma Lys 150 (136), His 83 (72), Tyr 117 (105), Tyr 141 (127), com a função de auxiliar na estabilização do grupo carboxila. Adicionalmente, dentre os resíduos acima apresentados, foi observado que a Tyr e Arg na porção C-terminal como sendo os mais conservados entre as sequências no alinhamento, sugerindo maior importância na função da proteína.

Uma hipótese acerca da menor conservação de aminoácidos no grupo anidrobionte é a de que na entrada e recuperação da anidrobiose ocorre a fragmentação do material genético e durante a “montagem” do mesmo aumenta a chance de erros no reparo, na aquisição horizontal de genes, como também a presença de cromossomos sem homólogos morfológicamente reconhecíveis, impedindo a reparação homóloga, e então favorecendo que fiquem “livres” para divergir (Gusev *et al.*, 2010; Boothby *et al.*, 2015; Ricci, 2017).

Em relação a estrutura terciária, é mostrado ser característico dessa proteína uma estrutura de β -barril, composta por 10 folhas β dispostas de forma antiparalela que formam um bolsão de ligação com ácidos graxos, e contendo 2 hélices-volta hélices responsáveis pela formação de uma região de “portal” de entrada na porção N terminal (Hauerland *et al.*, 2003). Na análise de sobreposição das estruturas, foi observado que apresentam ser semelhantes (RMSD $\leq 2,5$), sendo isso, de acordo com Santos Filho e Alencastro (2003), sugestivo que estas proteínas possuam mesma função e que se apresentem conservadas ao longo do tempo. Entre as estruturas sobrepostas neste estudo, as maiores diferenças observadas foram nas regiões das α -hélices e a presença de um prolongamento na região N-terminal – regiões estas que além de se mostrarem estruturalmente diferentes, estão em proximidade com as posições as quais foram encontradas diferenças na conservação na sequência primária.

Referente a busca na literatura, para a maioria das posições não foi encontrada uma função biológica, mas para três posições foram identificadas (44, 49 e 105). Para as duas primeiras posições, de acordo com Tillman *et al.* (2019), aminoácidos positivamente carregados nas α -hélices intermedeiam a interação da proteína com membranas; além disso, diversas FABPs apresentam um SLN composto por dois resíduos de Lys e uma Arg nessa região. LBP-3 apresenta uma composição de

aminoácidos positivamente carregados na proximidade das posições 44 e 49 (Figura 15A). No entanto, não apresenta o SLN (Figura 15B), mas possui um sinal de endereçamento extracelular composto pelos 21 aminoácidos iniciais.

De acordo com Zhang *et al.* (2020), o produto gênico de *lbp-3* de *C. elegans* possui localização extracelular; entretanto, mais detalhes não foram apresentados. Plenefisch *et al.* (2000), estudando LBPs em *C. elegans* demonstrou que *lbp-3* é expresso nas células musculares da parede corporal, que por sua vez estão em contato com o pseudoceloma, e propõe que a proteína seja secretada para o fluido perientérico, atuando no transporte de lipídios entre o intestino e a parede do corpo.

Dessa forma, baseado nos resultados apresentados no presente trabalho e nos trabalhos de (Wright, 1989a; b; Plenefisch *et al.*, 2000; Wharton *et al.*, 2008), é proposto que durante a entrada no estado anidrobiótico, LBP-3 atue realizando o transporte extracelular de ácidos graxos para a cutícula, para a formação da barreira lipídica associada ao sucesso na tolerância a dessecação.

A última posição analisada na estrutura foi a 105, e de acordo com Gutierrez-Gonzalez *et al.* (2002), FABPs podem apresentar até seis resíduos de cisteína em sua sequência primária, dentre eles alguns apresentando potencial para formação de pontes dissulfeto. De acordo com (Bulaj, 2005), diversas proteínas que são secretadas para meio extracelular, onde desempenham sua função, apresentam a formação de pontes dissulfeto de forma a aumentar a estabilidade de sua estrutura, evitando a desnaturação.

No entanto, LBP-3 apresentou possuir baixa probabilidade de formação de pontes dissulfeto (Tabela 9; Apêndice P). Além disso, a posição 105 parece fazer parte de um conjunto de aminoácidos posicionados em oposição às α -hélices (posições 25, 83, 85, 105 e 107 do alinhamento). De acordo com Gutierrez-Gonzalez *et al.* (2002), esse conjunto de posições estão relacionados a maior estabilidade estrutural da proteína por apresentarem características hidrofóbicas, Contudo, em LBP-3 foi observado uma composição de resíduos hidrofílicos (Figura 17), de tal forma que tais achados sugerem que LBP-3 possa ser uma proteína com menor estabilidade estrutural.

Por fim, apesar dos resultados encontrados no presente trabalho sugerirem que ácidos graxos interferem na tolerância a dessecação extrema, e que *lbp-3* potencialmente é um novo gene relacionado a anidrobiose, o estudo apresentou algumas limitações, tal como a utilização de apenas dois ácidos graxos, avaliados de

forma individual. Também, se mostra necessário a realização do silenciamento de *lbp-3* para a confirmação de seu envolvimento com a anidrobiose. Esse experimento foi tentado por meio da interferência por RNA com shRNAs multiméricos (*short hairpin RNAs*); no entanto, não funcionou (Apêndices G e H). Dessa forma, futuramente será tentada novamente a realização do experimento de silenciamento utilizando *dicer substrates* (versões um pouco maiores de siRNAs – *short interfering RNAs*).

Conclusão

6. Conclusão

Os achados do presente trabalho sugerem que a composição dos lipídios do nematoide *P. superbus* interferem na sua tolerância a dessecação, e que LBP-3 possivelmente atue transportando ácidos graxos extracelularmente, para a cutícula, para formação de uma barreira lipídica que potencialmente atua protegendo o animal contra a rápida desidratação durante a entrada em anidrobiose (Figura 18).

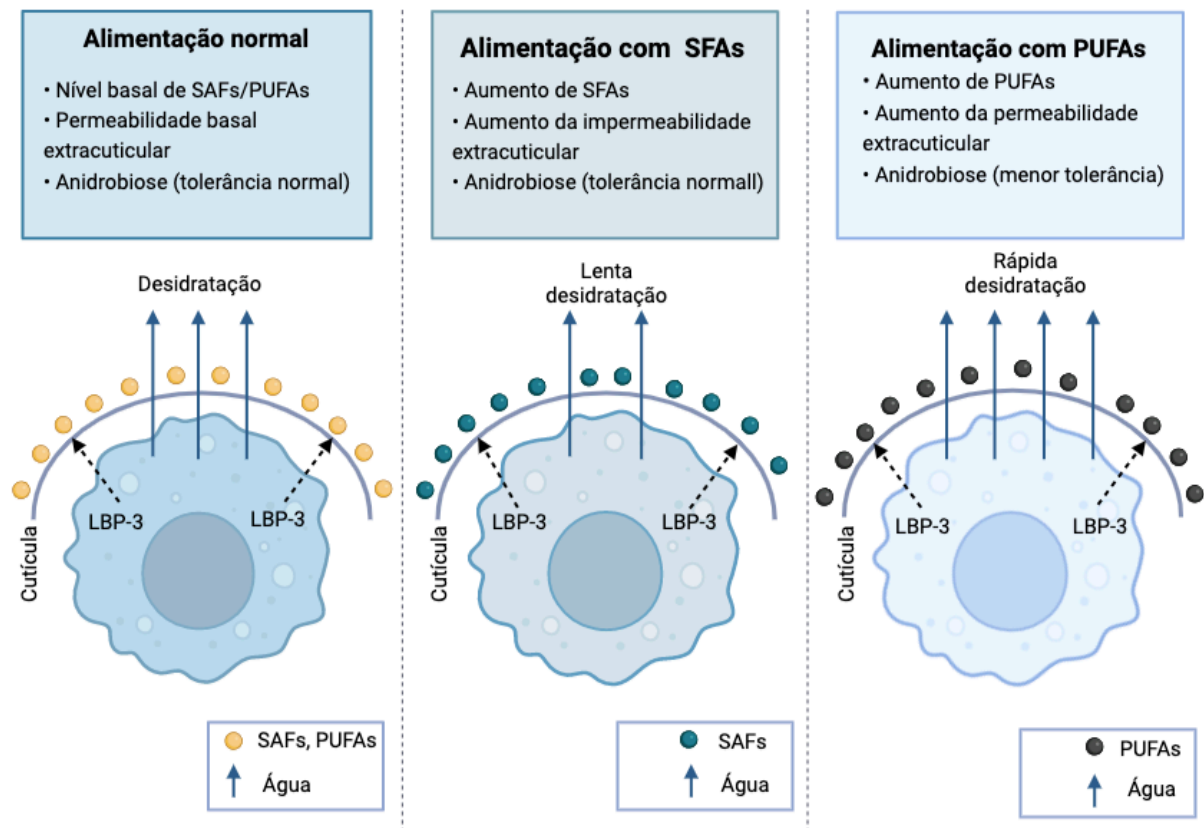


Figura 18. Mecanismo proposto. Em condições normais de alimentação, isto é, equilíbrio na relação entre ácidos graxos saturados e insaturados, não há interferência na tolerância do nematoide *P. superbus* a anidrobiose (alimentação normal, à esquerda). Em condições de maior disponibilidade de ácidos graxos saturados (alimentação com SFAs, ao centro), possivelmente não há interferência na tolerância do *P. superbus* a anidrobiose, uma vez que se trata de organismo eficientemente tolerante à dessecação extrema. Entretanto, o aumento da disponibilidade de ácidos graxos poli-insaturados (alimentação com PUFAs; à direita) possivelmente aumenta a perda de água durante a dessecação resultando na menor tolerância do *P. superbus* a dessecação extrema.

Referências

7. Referências

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic Local Alignment Search Tool. **J. Mol. Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct 5 1990. ISSN 0022-2836.

ALTUN, Z.; HALL, D. J. W. H. W. W. O. H. C. H. Handbook of *C. elegans* Anatomy. 2005.

ARMSTRONG, E. H. et al. Structural basis for ligand regulation of the fatty acid-binding protein 5, peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (FABP5-PPAR β/δ) signaling pathway. **JBC**, v. 289, n. 21, p. 14941-14954, 2014. ISSN 0021-9258.

AROIAN, R. V. et al. A Free-Living Panagrolaimus Sp from Armenia Can Survive in Anhydrobiosis for 8.7 Years. **J. Nemat**, v. 25, n. 3, p. 500-502, Sep 1993. ISSN 0022-300x.

AYERS, S. D. et al. Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPAR γ by FABP4. v. 46, n. 23, p. 6744-6752, 2007. ISSN 0006-2960.

BIOVIA, D. S. **Discovery Studio Visualizer Software**: Version 2017.

BOOTHBY, T. C. et al. Evidence for extensive horizontal gene transfer from the draft genome of a tardigrade. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 52, p. 15976-81, Dec 29 2015. ISSN 1091-6490.

BOSCH, J. et al. Microbial anhydrobiosis. **Environ Microbiol**, v. 23, n. 11, p. 6377-6390, Nov 2021. ISSN 1462-2920.

BOSTROM, S. J. N. Descriptions and morphological variability of three populations of Panagrolaimus Fuchs, 1930 (Nematoda: Panagrolaimidae). v. 34, n. 2, p. 144-155, 1988. ISSN 0028-2596.

BROCK, T. J.; BROWSE, J.; WATTS, J. L. Fatty acid desaturation and the regulation of adiposity in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 176, n. 2, p. 865-75, Jun 2007. ISSN 0016-6731.

BULAJ, G. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. **Biotechnol Adv**, v. 23, n. 1, p. 87-92, Jan 2005. ISSN 0734-9750.

CHMURZYŃSKA, A. J. J. O. A. G. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. **J. Appl. Genet.** v. 47, n. 1, p. 39-48, 2006. ISSN 2190-3883.

CLEGG, J. S. Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 128, n. 4, p. 613-624, Apr 2001. ISSN 1096-4959.

CROWE, J. H. J. T. A. N. Anhydrobiosis: an unsolved problem. **Am. Nat.** v. 105, n. 946, p. 563-573, 1971. ISSN 0003-0147.

DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. In: (Ed.). **Chemical biology**: Springer, 2015. p.243-250.

DE TOLEDO-SILVA, G. et al. Intracellular lipid binding protein family diversity from Oyster *Crassostrea gigas*: genomic and structural features of invertebrate lipid transporters. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 46486, Apr 21 2017. ISSN 2045-2322.

DELINE, M. L.; VRABLIK, T. L.; WATTS, J. L. Dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids in *Caenorhabditis elegans*. **J Vis Exp**, n. 81, p. e50879, Nov 29 2013. ISSN 1940-087X.

DEVIATIIAROV, R. et al. Diversity and Regulation of S-Adenosylmethionine Dependent Methyltransferases in the Anhydrobiotic Midge. **Insects**, v. 11, n. 9, p. 634, Sep 16 2020. ISSN 2075-4450.

DUPONT, S. et al. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 98, n. 21, p. 8821-8834, 2014. ISSN 1432-0614.

EARLIA, N. et al. The Potential Effect of Fatty Acids from *Pliek U* on Epidermal Fatty Acid Binding Protein: Chromatography and Bioinformatic Studies. **Sains Malaysiana**, v. 48, n. 5, p. 1019-1024, May 2019. ISSN 0126-6039.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 5, p. 1792-7, 2004. ISSN 1362-4962.

ERKUT, C. et al. Molecular strategies of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva to survive extreme desiccation. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82473, 2013. ISSN 1932-6203.

EVANGELISTA, C. C. S. et al. Multiple genes contribute to anhydrobiosis (tolerance to extreme desiccation) in the nematode *Panagrolaimus superbus*. **Genet Mol Biol**, v. 40, n. 4, p. 790-802, Oct-Dec 2017. ISSN 1415-4757.

EVANGELISTA, C. C. S.; PEREIRA, T. C. Identificação funcional de genes associados à anidrobiose via RNAi em média escala e caracterização do gene peroxirredoxina. 2014.

FERRÈ, F.; CLOTE, P. J. N. A. R. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. **Nucleic Acids Res.** v. 34, n. suppl_2, p. W182-W185, 2006. ISSN 0305-1048.

FOLICK, A. et al. Lysosomal signaling molecules regulate longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Science**. v. 347, n. 6217, p. 83-86, 2015. ISSN 0036-8075.

FU, Z.; AGUDELO, P.; WELLS, C. E. Detoxification-related gene expression accompanies anhydrobiosis in the foliar nematode (*Aphelenchoides fragariae*). **J Nematol**, v. 52, p. 1-12, 2020. ISSN 0022-300X.

FUKUDA, Y. et al. Structural insights into a secretory abundant heat-soluble protein from an anhydrobiotic tardigrade, *Ramazzottius varieornatus*. **FEBS letters**. v. 591, n. 16, p. 2458-2469, 2017. ISSN 0014-5793.

FURUHASHI, M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. **Nat. Rev. Drug Discov**, v. 7, n. 6, p. 489-503, Jun 2008. ISSN 1474-1776.

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

GOLDBERG, T. et al. LocTree3 prediction of localization. **Nucleic Acids Res.** v. 42, n. W1, p. W350-W355, Jul 1 2014. ISSN 0305-1048.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Total RNA Extraction from *Caenorhabditis elegans*. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2020, n. 9, p. 101683, Sep 1 2020. ISSN 1559-6095.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **Int J Parasitol**, v. 30, n. 9, p. 995-1000, Aug 2000. ISSN 0020-7519.

GUIDELLI, G. J. T. D. C. D. C. F. D. F., CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, RIBEIRÃO PRETO. Análise dos efeitos do silenciamento de uma glutatona peroxidase no nematoide anidrobiótico *Panagrolaimus superbus*. 94 f. 2011.

GUSEV, O. et al. Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: linkage with radioresistance. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e14008, Nov 16 2010. ISSN 1932-6203.

GUTIERREZ-GONZALEZ, L. H. et al. Solution structure and backbone dynamics of human epidermal-type fatty acid-binding protein (E-FABP). **Biochem J**, v. 364, n. Pt 3, p. 725-37, Jun 15 2002. ISSN 0264-6021.

HAN, S. et al. Mono-unsaturated fatty acids link H3K4me3 modifiers to *C. elegans* lifespan. **Nature**, v. 544, n. 7649, p. 185-190, Apr 13 2017. ISSN 1476-4687.

HASHIMOTO, T. et al. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. **Nat Commun**, v. 7, n. 1, p. 12808, Sep 20 2016. ISSN 2041-1723.

HAUNERLAND, N. H.; SPENER, F. J. A. I. M.; BIOLOGY, C. Properties and physiological significance of fatty acid binding proteins. **Adv. Med. Biol.** v. 33, p. 99-122, 2003. ISSN 1569-2558.

HOFFMANN, J. M.; PARTRIDGE, L. Nuclear hormone receptors: Roles of xenobiotic detoxification and sterol homeostasis in healthy aging. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 50, n. 5, p. 380-92, 2015. ISSN 1549-7798.

HOLM, L. Dali server: structural unification of protein families. **Nucleic Acids Res**, v. 50, n. W1, p. W210-5, May 24 2022. ISSN 1362-4962.

HORIKAWA, M.; SAKAMOTO, K. Fatty-acid metabolism is involved in stress-resistance mechanisms of *Caenorhabditis elegans*. **Biochem. Biophys. Res. Comm**, v. 390, n. 4, p. 1402-1407, Dec 25 2009. ISSN 0006-291x.

HORNAK, V. et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins**, v. 65, n. 3, p. 712-25, Nov 15 2006. ISSN 1097-0134.

HU, P. J. Dauer. **Wormbook: The Online Review of *C. elegans* Biology**, 2018.

JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-+, Aug 26 2021. ISSN 0028-0836.

JURRUS, E. et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Sci**, v. 27, n. 1, p. 112-128, Jan 2018. ISSN 1469-896X.

KAUL, T. K. et al. Bacterial fatty acids enhance recovery from the dauer larva in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86979, 2014. ISSN 1932-6203.

KEILIN, D. The Leeuwenhoek Lecture - the Problem of Anabiosis or Latent Life - History and Current Concept. **Proc. Royal Soc. B**, v. 150, n. 939, p. 149-191, 1959. ISSN 0080-4649.

KIM, Y. C. et al. Stability kinetics of influenza vaccine coated onto microneedles during drying and storage. **Pharm Res**, v. 28, n. 1, p. 135-44, Jan 2011. ISSN 1573-904X.

KRAUSE, A. W.; CARLEY, W. W.; WEBB, W. W. Fluorescent Erythrosin-B Is Preferable to Trypan Blue as a Vital Exclusion Dye for Mammalian-Cells in Monolayer-Culture. **J. Histochem. Cytochem**, v. 32, n. 10, p. 1084-1090, 1984. ISSN 0022-1554.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. **J. Mol. Bio**, v. 157, n. 1, p. 105-132, 1982. ISSN 0022-2836.

LYTLE, J. S. et al. Stability of a commercially prepared fish oil (omega-3 fatty acid) laboratory rodent diet. **Nutr Cancer**, v. 17, n. 2, p. 187-94, 1992. ISSN 0163-5581.

MA, C. et al. Transcriptomic analysis reveals numerous diverse protein kinases and transcription factors involved in desiccation tolerance in the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. **Hortic Res**, v. 2, p. 15034, 2015. ISSN 2662-6810.

MARTELL, J. et al. Global Cysteine-Reactivity Profiling during Impaired Insulin/IGF-1 Signaling in *C. elegans* Identifies Uncharacterized Mediators of Longevity. v. 23, n. 8, p. 955-966, 2016. ISSN 2451-9456.

MCGILL, L. M. et al. Anhydrobiosis and Freezing-Tolerance: Adaptations That Facilitate the Establishment of *Panagrolaimus* Nematodes in Polar Habitats. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0116084, Mar 6 2015. ISSN 1932-6203.

MCKILLOP, I. H.; GIRARDI, C. A.; THOMPSON, K. J. Role of fatty acid binding proteins (FABPs) in cancer development and progression. **Cell Signal**, v. 62, p. 109336, Oct 2019. ISSN 1873-3913.

MEHDIZADEH, S.; SHOKOOHI, E.; ABOLAFIA, J. Morphological and molecular characterisation of *Panagrolaimus Fuchs, 1930* (Nematoda, Rhabditida, Panagrolaimidae) species from Iran. **Russ. J. Nematol**, v. 21, n. 2, p. 93-115, 2013. ISSN 0869-6918.

MINARDI, R. RMSD e RMSF. OnlineBioinfo, 2022. Disponível em: [https://onlinebioinfo.com/2022/02/01/rmsd-e-rmsf/#:~:text=RMSD%20%C3%A9%20a%20sigla%20para,ver%20exemplo%20na20Figura%201\).](https://onlinebioinfo.com/2022/02/01/rmsd-e-rmsf/#:~:text=RMSD%20%C3%A9%20a%20sigla%20para,ver%20exemplo%20na20Figura%201).) Acesso em: 16 de jan. 2023.

NJUME, F. N. et al. A lipid transfer protein ensures nematode cuticular impermeability. **iScience**, v. 25, n. 11, p. 105357, Nov 18 2022. ISSN 2589-0042.

O'ROURKE, E. J. et al. ω -6 Polyunsaturated fatty acids extend life span through the activation of autophagy. **Genes Dev.** v. 27, n. 4, p. 429-440, 2013. ISSN 0890-9369.

OKU, K. et al. NMR and quantum chemical study on the OH \cdots π and CH \cdots O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: Implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. **J. Am. Chem. Soc.** v. 125, n. 42, p. 12739-12748, 2003. ISSN 0002-7863.

OLIVER, M. J. et al. A combined subtractive suppression hybridization and expression profiling strategy to identify novel desiccation response transcripts from *Tortula ruralis* gametophytes. **Physiol Plant**, v. 136, n. 4, p. 437-60, Aug 2009. ISSN 1399-3054.

PAZOS-ROJAS, L. A. et al. Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy. **PLoS One**, v. 14, n. 7, p. e0219554, 2019. ISSN 1932-6203.

PLENEFISCH, J. et al. Secretion of a novel class of iFABPs in nematodes: coordinate use of the *Ascaris*/*Caenorhabditis* model systems. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 105, n. 2, p. 223-236, 2000. ISSN 0166-6851.

REBECCHI, L.; ALTIERO, T.; GUIDETTI, R. Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. **Isj-Invert Surviv J**, v. 4, n. 2, p. 65-81, 2007. ISSN 1824-307x.

REN, Q. et al. Membrane and lipid metabolism plays an important role in desiccation resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Bmc Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, Nov 10 2020. ISSN 1471-2180.

RICCI, C.; CAPRIOLI, M. Anhydrobiosis in bdelloid species, populations and individuals. **Integr Comp Biol**, v. 45, n. 5, p. 759-63, Nov 2005. ISSN 1540-7063.

RICCI, C. J. H. Bdelloid rotifers: 'sleeping beauties' and 'evolutionary scandals', but not only. v. 796, n. 1, p. 277-285, 2017. ISSN 1573-5117.

RIZZO, A. M. et al. Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 156, n. 2, p. 115-21, Jun 2010. ISSN 1879-1107.

ROZENFELDE, L.; RAPOPORT, A. J. A. V. L. Anhydrobiosis in yeast: is it possible to reach anhydrobiosis for yeast grown in conditions with severe oxygen limitation?. **Anton Leeuw**, v. 106, n. 2, p. 211-217, 2014. ISSN 1572-9699.

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. D. J. Q. N. Modelagem de proteínas por homologia. v. 26, p. 253-259, 2003. ISSN 0100-4042.

SAVORY, F. R.; SAIT, S. M.; HOPE, I. A. J. P. O. DAF-16 and $\Delta 9$ desaturase genes promote cold tolerance in long-lived *Caenorhabditis elegans* age-1 mutants. **Plos One**. v. 6, n. 9, p. e24550, 2011. ISSN 1932-6203.

SCHILL, R. O. et al. Molecular mechanisms of tolerance in tardigrades: new perspectives for preservation and stabilization of biological material. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 4, p. 348-52, Jul-Aug 2009. ISSN 1873-1899.

SCHOKRAIE, E. et al. Proteomic analysis of tardigrades: towards a better understanding of molecular mechanisms by anhydrobiotic organisms. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9502, Mar 3 2010. ISSN 1932-6203.

SCHRÖDINGER, L.; DELANO, W. J. G. S. T. I. N. C. R. F. T. R. The PyMOL molecular graphics system, version 2.0 Schrödinger, LLC (2017).

SCHULZE, J.; SCHIERENBERG, E. Evolution of embryonic development in nematodes. **Evodevo**, v. 2, n. 1, p. 18, Sep 20 2011. ISSN 2041-9139.

SELVAN, S.; GAUGLER, R.; GREWAL, P. S. Water-Content and Fatty-Acid Composition of Infective Juvenile Entomopathogenic Nematodes during Storage. **J. Parasit**, v. 79, n. 4, p. 510-516, Aug 1993. ISSN 0022-3395.

SHANNON, A. J. et al. The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics of species and strains of *Panagrolaimus* (Nematoda, Panagrolaimidae). **J Exp Biol**, v. 208, n. Pt 12, p. 2433-45, Jun 2005. ISSN 0022-0949.

SINCLAIR, B. J.; GIBBS, A. G.; ROBERTS, S. P. Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster*. **Insect Mol Biol**, v. 16, n. 4, p. 435-43, Aug 2007. ISSN 0962-1075.

SMATHERS, R. L.; PETERSEN, D. R. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. **Hum Genomics**, v. 5, n. 3, p. 170-91, Mar 2011. ISSN 1479-7364.

STEINEGGER, M. et al. HH-suite3 for fast remote homology detection and deep protein annotation. **BMC Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 473, Sep 14 2019. ISSN 1471-2105.

STEINEGGER, M.; SODING, J. MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. **Nat Biotechnol**, v. 35, n. 11, p. 1026-1028, Nov 2017. ISSN 1546-1696.

STORCH, J.; CORSICO, B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. **Annu. Rev. Nutr**, v. 28, p. 73-95, 2008. ISSN 0199-9885.

STOREY, K. B. Regulation of hypometabolism: insights into epigenetic controls. **J. Experim. Bio**, v. 218, n. 1, p. 150-159, Jan 2015. ISSN 0022-0949.

TANAKA, T. et al. Effects of growth temperature on the fatty acid composition of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. **Lipids**. v. 31, n. 11, p. 1173-1178, 1996. ISSN 0024-4201.

TEUFEL, F. et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nat. Biotech**, v. 40, n. 7, p. 1023+, Jul 2022. ISSN 1087-0156.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochem Mol Biol Educ**, v. 39, n. 2, p. 145-54, Mar-Apr 2011. ISSN 1539-3429.

TILLMAN, M. C. et al. Structural characterization of life-extending *Caenorhabditis elegans* Lipid Binding Protein 8. **Sci. Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019. ISSN 2045-2322.

TUNNACLIFFE, A.; LAPINSKI, J. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 358, n. 1438, p. 1755-71, Oct 29 2003. ISSN 0962-8436.

TYSON, T. et al. A molecular analysis of desiccation tolerance mechanisms in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus* using expressed sequenced tags. **BMC Res Notes**, v. 5, n. 1, p. 68, Jan 26 2012. ISSN 1756-0500.

TYSON, T. et al. Gene induction by desiccation stress in the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* reveals parallels with drought tolerance mechanisms in plants. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 7, p. 763-76, Jun 2007. ISSN 0020-7519.

VAN GILST, M. R. et al. Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. **PLoS Biol**, v. 3, n. 2, p. e53, Feb 2005. ISSN 1545-7885.

VAN GILST, M. R.; HADJIVASSILIOU, H.; YAMAMOTO, K. R. A *Caenorhabditis elegans* nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 38, p. 13496-501, Sep 20 2005. ISSN 0027-8424.

VAN LEEUWENHOEK, A. **Letter to Hendrik van Bleyswijk**, dated 9 February 1702. Disponível em: <https://lensonleeuwenhoek.net/content/wrote-letter-105-1696-08-29-ab-174-hendrik-van-bleyswijk>. Acesso em: 04 Jan. 2022.

WANG, C. et al. Towards Decrypting Cryptobiosis-Analyzing Anhydrobiosis in the Tardigrade *Milnesium tardigradum* Using Transcriptome Sequencing. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. e92663, Mar 20 2014. ISSN 1932-6203.

WATANABE, M. et al. Induction of anhydrobiosis in fat body tissue from an insect. **J Insect Physiol**, v. 51, n. 6, p. 727-31, Jun 2005. ISSN 0022-1910.

WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, May 1 2009. ISSN 1367-4803.

WATTS, J. L.; BROWSE, J. Dietary manipulation implicates lipid signaling in the regulation of germ cell maintenance in *C. elegans*. **Dev Biol**, v. 292, n. 2, p. 381-92, Apr 15 2006. ISSN 0012-1606.

WEBSTER, C. M.; DELINE, M. L.; WATTS, J. L. Stress response pathways protect germ cells from omega-6 polyunsaturated fatty acid-mediated toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Dev Biol**, v. 373, n. 1, p. 14-25, Jan 1 2013. ISSN 1095-564X.

WEŁNICZ, W. et al. Anhydrobiosis in tardigrades—the last decade. v. 57, n. 5, p. 577-583, 2011. ISSN 0022-1910.

WHARTON, D. A. et al. A surface lipid may control the permeability slump associated with entry into anhydrobiosis in the plant parasitic nematode *Ditylenchus dipsaci*. **J. Exp. Biol**, v. 211, n. 18, p. 2901-2908, Sep 15 2008. ISSN 0022-0949.

WHARTON, D. A. J. C. B. Anhydrobiosis: the model worm as a model? , v. 21, n. 15, p. R578-R579, 2011. ISSN 0960-9822.

WHEELER, D. L. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 1, p. 28-33, Jan 1 2003. ISSN 0305-1048.

WILSON, C. G.; SHERMAN, P. W. Anciently asexual bdelloid rotifers escape lethal fungal parasites by drying up and blowing away. **Science**, v. 327, n. 5965, p. 574-6, Jan 29 2010. ISSN 1095-9203.

WRIGHT, J. C. Desiccation Tolerance and Water-Retentive Mechanisms in Tardigrades. **J. Exp. Biol**, v. 142, n. 1, p. 267-292, Mar 1989a. ISSN 0022-0949.

WRIGHT, J. C. The tardigrade cuticle II. Evidence for a dehydration-dependent permeability barrier in the intracuticle. **Tissue Cell**, v. 21, n. 2, p. 263-79, 1989b. ISSN 0040-8166.

YAARI, M. et al. Transcriptome analysis of stress tolerance in entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema*. **Int J Parasitol**, v. 46, n. 2, p. 83-95, Feb 2016. ISSN 1879-0135.

YAMAGUCHI, A. et al. Two novel heat-soluble protein families abundantly expressed in an anhydrobiotic tardigrade. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e44209, 2012. ISSN 1932-6203.

ZHANG, Y. et al. Tracing the evolution of fatty acid-binding proteins (FABPs) in organisms with a heterogeneous fat distribution. **FEBS Open Bio**, v. 10, n. 5, p. 861-872, May 2020. ISSN 2211-5463.

Apêndices

8. Apêndices

8.1 Apêndice A – Crescimento populacional.

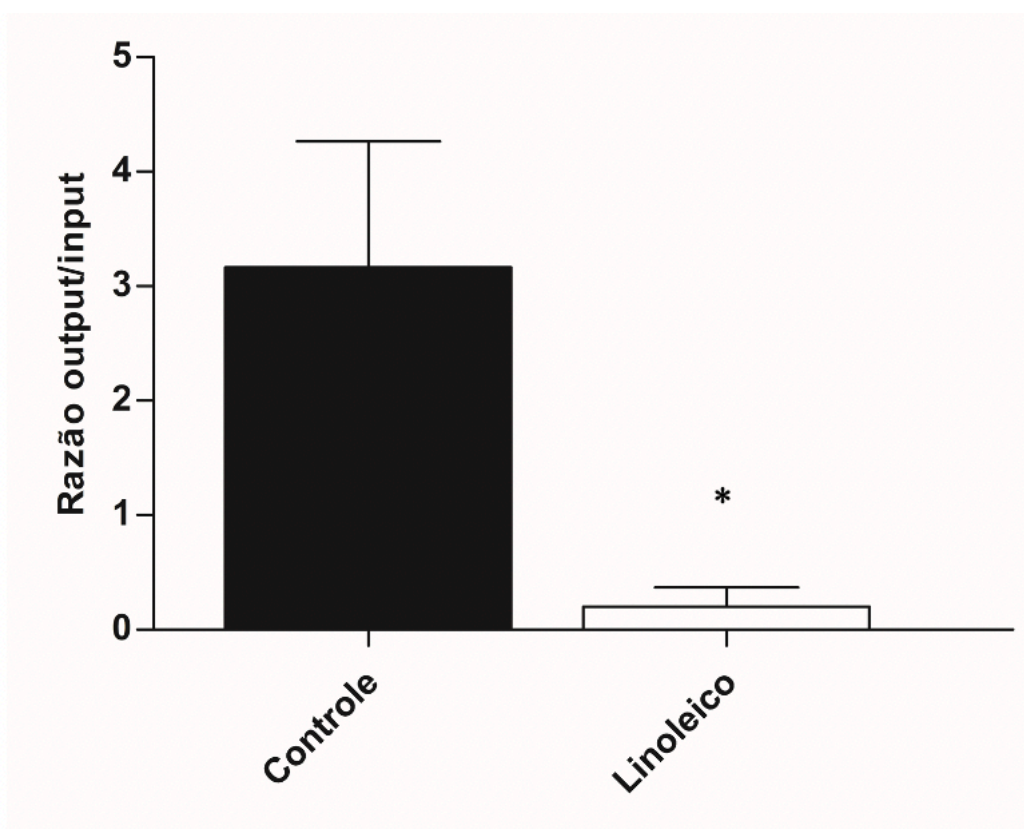


Figura 19. Crescimento populacional em *P. superbis*. Razão de crescimento populacional após 20 dias em placas de cultivo contendo NGM padrão utilizando *input* de 200 animais. Previamente ao início do experimento, os animais foram cultivados durante 20 dias em placas contendo NGM padrão (barra em preto) ou NGM suplementado com ácido linoleico (barra em branco). Dados apresentados como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$. Para o grupo suplementado com ácido linoleico o ensaio foi realizado em duplicata (barra em branco).

8.2 Apêndice B – Dados brutos do crescimento populacional após dessecação

Tabela 5. Crescimento populacional após dessecação.

Grupo	Crescimento populacional
Controle	1,35
Controle	1,33
Controle	10,1
Linoleico	0,9
Linoleico	0,8
Linoleico	0,25

Dados referentes o crescimento populacional após dessecação. Em destaque está apresentado o outlier removido na confecção do gráfico B da Figura 10.

8.3 Apêndice C – Sequências utilizadas para desenho dos *primers*.

lbp-3

GW406630.1 Ps_Lib1E_36DG02_PSC00876 Unstressed mixed stage *Panagrolaimus superbus* nematodes *Panagrolaimus superbus* cDNA, mRNA sequence

GGGGGTGCTAATCAAGCAATCGTCTGCTACTTTGAAAAATGTTATATGCTAAAAT
 TCTGTCATTAATAGTTCTAATATTTGCTGTTTCGACAGTAGAAATGTCTTCAGAAA
 TTCCAGAAAACCTTTCTAGGAAAATTTAAGCTTGATAAAAAGTGAAAATTTTGATGCT
 TATTTAGAAACAAAAGGCTTAAATTGGTTTCTTCGTAAAATAATTTGTCTGTCATC
 TGTTACTTATGTTTTTAAGAAAGGAAGTGAACCAGGAAAATATACATGTGTTGTT
 CATTCAAAGAAAACCTATCGAATATCCTGACTGGAAAATTGGTGAAATGTT **CGAAG**
GTGAGGGAATGGATGGAACTAACACAAGATAACTTTCACAAATGCCCAATGATA
ATACTCTTGATGAACATCATGATCGATATCAAATTGAAGGTGATAATCAAGAACT
TTATCATTATACTCGAGAAGGGGATTATCTTGTTCAAACCATGAGCAATAAAGGT
GTTACTGCAAAACGTTGGCATAAACTGGTG

Amplicon: 187 pb

fat-5

GW410416.1 Ps_Lib1E_36DF08_PSC02073 Unstressed mixed stage *Panagrolaimus superbus* nematodes *Panagrolaimus superbus* cDNA, mRNA sequence

GGGATGGATGATAAATTCTGTTTGCCATTTTTTTGGTTATAAACCTTATGATTCCC
 GAATTACCCCGTTAATTCA **ACTTGGACTTCATTGGTGGCA**TTAGGGGAAGGCG
GGCACAACCTATCACCATACCTTTCCACAAGATTA**TCGAACCAGTGAAATGCCAG**
TTATTTTAAATATTACAAAATCAATTATCGAATTTGGGGCTTCCATCGGATTAGCA
 TATGACTTGAAATCAGTTGCAAATGAAGTGATAAAAAGACAAAAAGAAAATTCG
 GTGATAAAATTGCAGTTAAAAAAGATTAAGTTATGTTTTGTTAAAGTTAAAAAT
 AAAATTTTTCCAG

Amplicon: 89 pb

nhr-49

CABFKN010010885.1:475-1281 Panagrolaimus superbus genome assembly, contig:
PSU_contig_20214, whole genome shotgun sequence

GCTATTCAGTTTGAACGTGATTCAATTGGTTCACCATCAAAAAAGTCTCGTTTCGT
CACCACCAATGCAATCTGGAACAGGAAATGGATTAGAGAGAATAACTCCACCGG
AAATAGGATCAGATGTTATTGATAATTTAATGGATATGGAAGCCCGAGTTAATCT
TGAAATGTCAAATCGATATCGAAATTCTGTAATAACATCAAATGGAAACGTTATG
GGACATCAAGGTGCTGAAACTTCAACACCATTGAGTCAAATAATAGCGAAGGA
TTATCAGCTTTTTCTCAACCAAACAAGGAACCATGCAATGTACAACAGATGATT
TGAATGAAATATCCCGAACAACGTTGTTATTGATGGTTGAATGGGCCA**AGCAGC**
TTCCACCATTCCAGATTTAACAATGGAAGATAAAATAATATTATTAAAGAATTAT
GCTCCTCAACATCTTATTCTTATG**CCGGCTTTTCGATCTCCTGA**TACAACAAAAG
TTTGCCTTTTCAATAATACTTCAATGTCACAAGATCAAACAAATGAACTTAATGGC
TTTGCTGCATTTAAACATCAAATATTACTCCAAGAGTCTTAGATGAAATTGTATG
GCCCATGAGACAATTACAAATGCGTGAACAAGAATTTGTATGTCTTAAAGCTCTG
GCGTTTTTACATCCAGAAGCTAAAGGACTTTCAACAACCTCACAGTCATTGATTC
GTGATGCAAGAAATAAAGTTTTGAAAGCATTGTATTCATTTATTTTGGCACAAAAT
CCTGAAGATGCTCCAACCTCGTTACGGTACTGTTTTT

Amplicon: 106 pb

8.4 Apêndice D – Teste de dimerização dos *primers*.

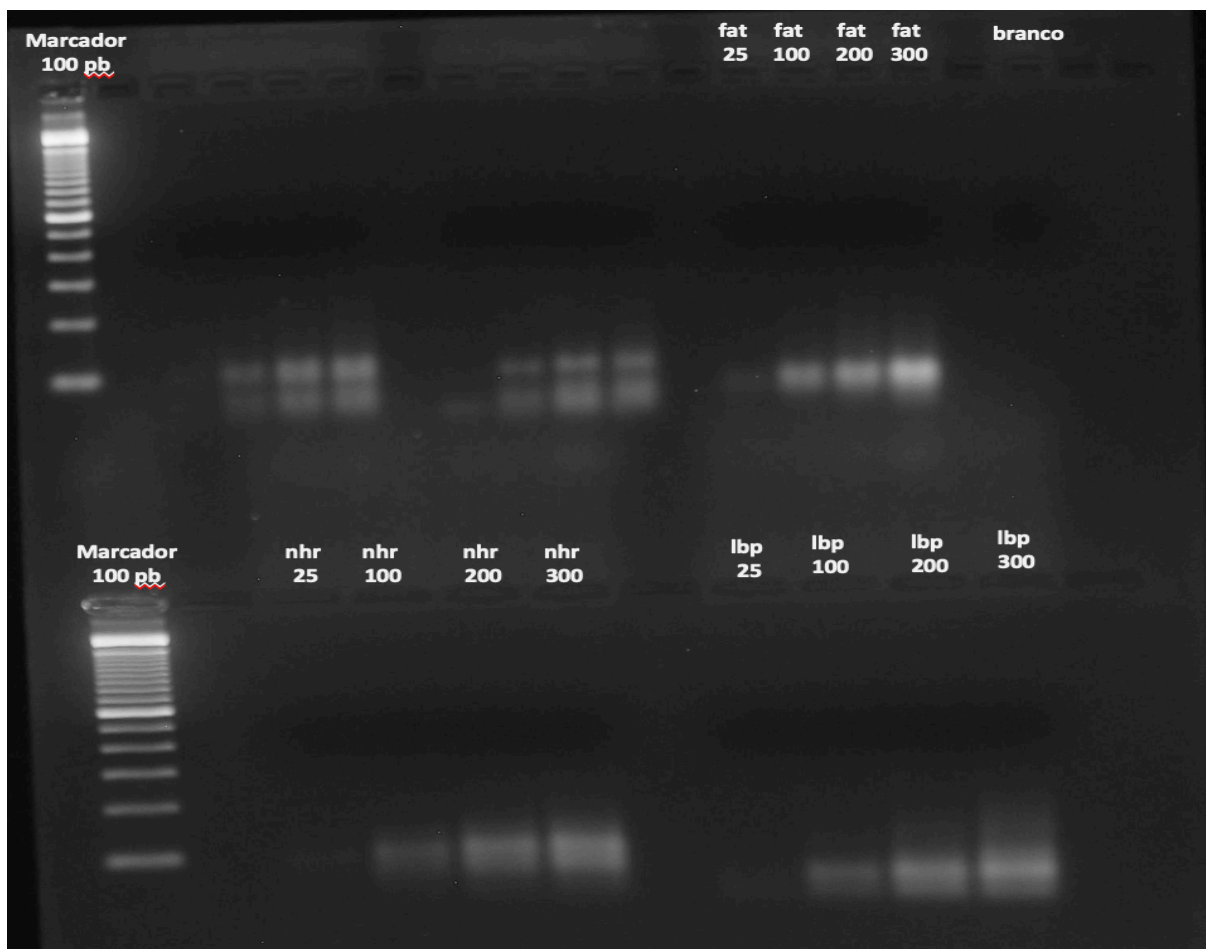


Figura 20. Gel de verificação de dímeros. Estão apresentadas diferentes concentrações dos *primers* (25 nM a 300 nM) desenhados para amplificação dos genes *lbp-3*, *fat-5* e *nhr-49*. Condições da PCR: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, 1 min a 72 °C, e uma etapa final de 2 min a 72 °C.

8.5 Apêndice E – Gráficos de amplificação e de temperatura *melting*.

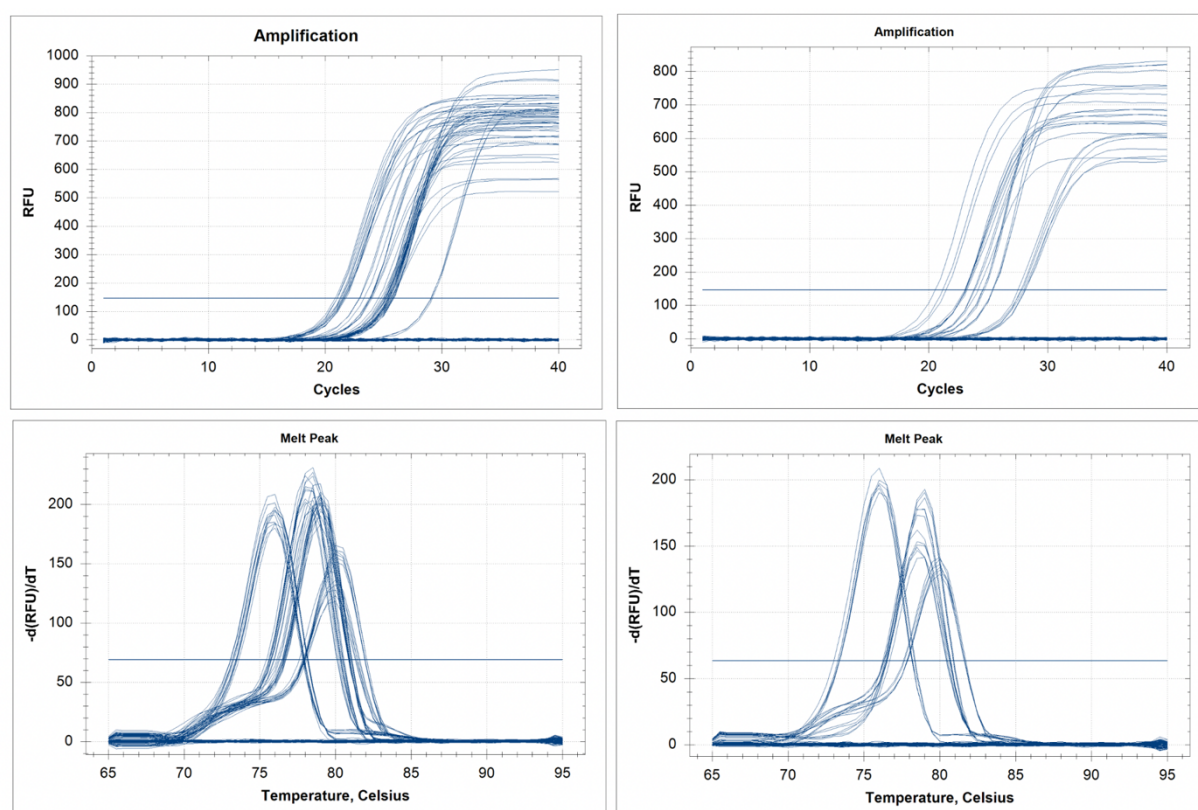


Figura 21. Gráficos de amplificação e de temperatura de *melting* das amostras hidratadas e dessecadas.

8.6 Apêndice F – Sequências utilizadas para desenho de shRNA bivalente.

lbp-3

GW406630.1 Ps_Lib1E_36DG02_PSC00876 Unstressed mixed stage Panagrolaimus superbis nematodes Panagrolaimus superbis cDNA, mRNA sequence

GGGGGTGCTAATCAAGCAATCGTCTGCTACTTTGAAAAATGTTATATGCTAAAAT
TCTGTCATTAATAGTTCTAATATTTGCTGTTTTCGACAGTAGAAATGTCTTCAGAAA
TTCCAGAAAACCTTTCTAGGAAAATTTAAGCTTGATAAAAAGTGAAAATTTTGATGCT
TATTTAGAAACAAAAGGCTTAAATTGGTTTCTTCGTAAAATAATTTGTCTGTCATC
TGTTACTTATGTTTTTAAGAAAGGAAGTGAACCAGGAAAATATACATGTGTTGTT
CATTCAAAGAAAACCTATCGAATATCCTGACTGGAAAATTGGTGAAATGTTCGAAG
GTGAGGGAATGGATGGAACATAACACAAGATAACTTTCACAATGCCCAATGATA
ATACTCTTGATGAACATCATGATCGATATCAAATTGAAGGTGATAATCAAGAACT
TTATCATTATACTCGAGAAGGGGATTATCTTGTTCAAACCATGAGCAATAAAGGT
GTTACTGCAAAACGTTGGCATAAACTGGTG

>Bivalent_shRNA

CTTGTTCAAACCTGACAGGAAGGGTTTGAACAAGATAATCCCCTTCTCTCCGTCT
GCTACTTTGAAAAATGTTTGACAGGAAGAACATTTTTCAAAGTAGCAGACGCTCT
CAAGGGGATTAT

gfp

CAA58790.1 green fluorescent protein, partial [*Aequorea victoria*]

ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAG
ATGGTGATGTTAATGGGCAAAAATTCTCTGTCAGGGGAGAGGGTGAAGGTGAT
GCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGGAAGCTACCTG
TTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTACAATGCTTCTCAAG
ATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTCTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGG
TTATGTACAGGAAAGAAGCTATATTTTACAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGT
GCTGAAGTCAAGTTTGAGGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGT
ATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAAATGGAATACAACCTATA
ACTCACATAATGTATACATCATGGGAGACAAACCAAAGAATGGCATCAAAGTTA
ACTTCAAAATTAGACACAACATTAAGATGGAAGCGTTCAATTAGCAGACCATTA
TCAACAAAATACTCC

AATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCT
GCCCTTTCCCAAGATCCCCACGGAAAGAGAGATCACATGGTCCTTCTTGAGTTT
GTTACATCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAA

>Bivalent_shRNA

CCTTGTTAATAGTGACAGGAAGCTATTAACAAGGGTATCACCTCCTCTCGCAG
ACCATTATCAACAAAATACTGACAGGAAGGTATTTTGTGATAATGGTCTGCCTC
TCGAGGGTGATAC

8.7 Apêndice G – Eletroforese dos produtos da transcrição *in vitro*.

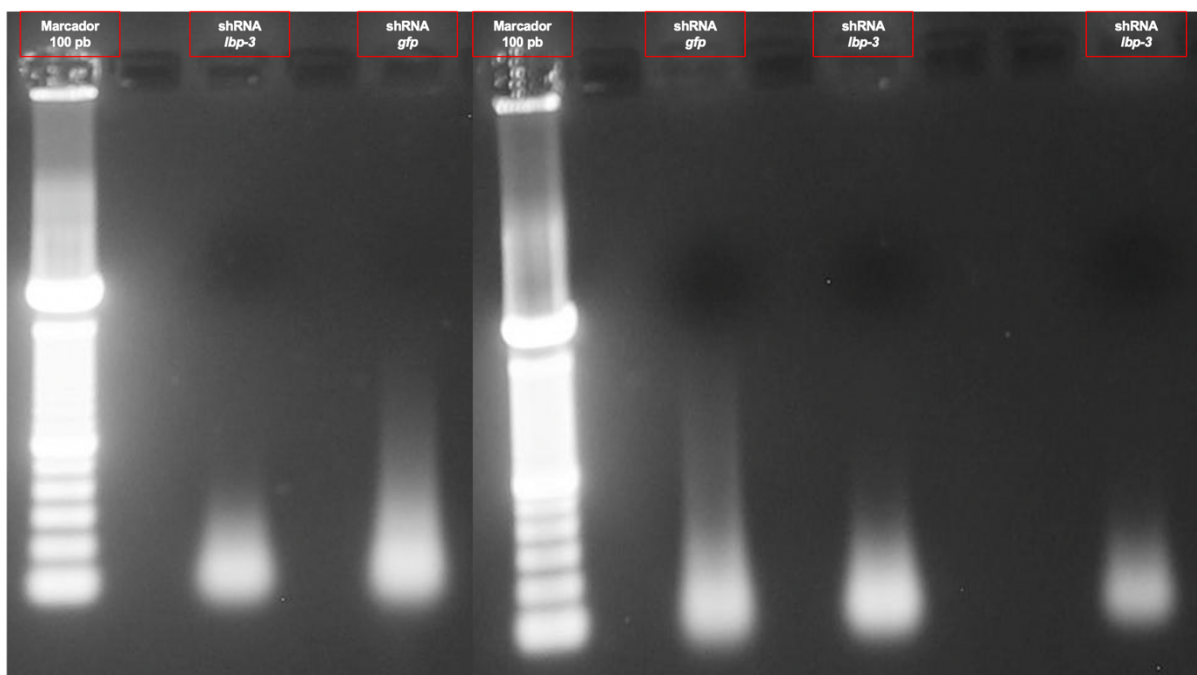


Figura 22. Eletroforese dos produtos da transcrição *in vitro* realizadas em momentos diferentes.

8.8 Apêndice H – Expressão gênica após realização do silenciamento por shRNA.

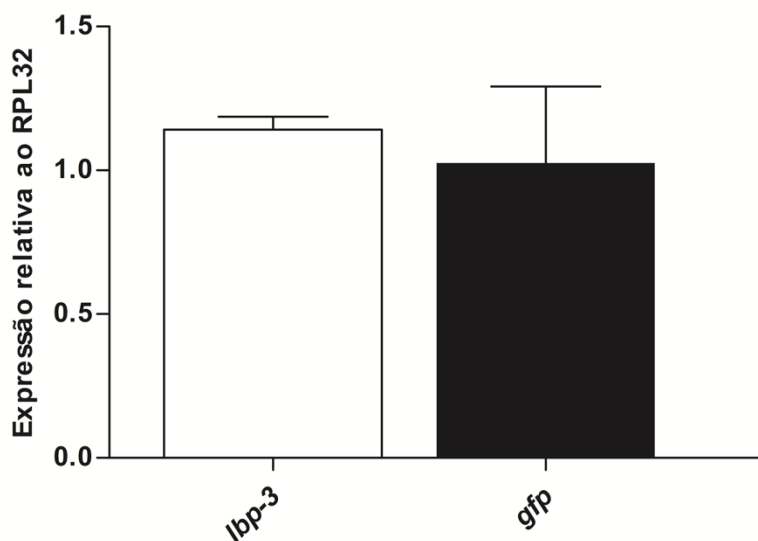


Figura 23. Expressão gênica de *lbp-3* após silenciamento gênico. Barra em branco representa nível de expressão gênica de *lbp-3* de animais tratados com shRNA para silenciamento do gene *lbp-3*; Barra em preto representa o nível de expressão gênica do gene *lbp-3* de animais tratados com shRNA para silenciamento do gene *gfp* (controle).

8.9 Apêndice I – Cladograma de membros da família das FABPs.

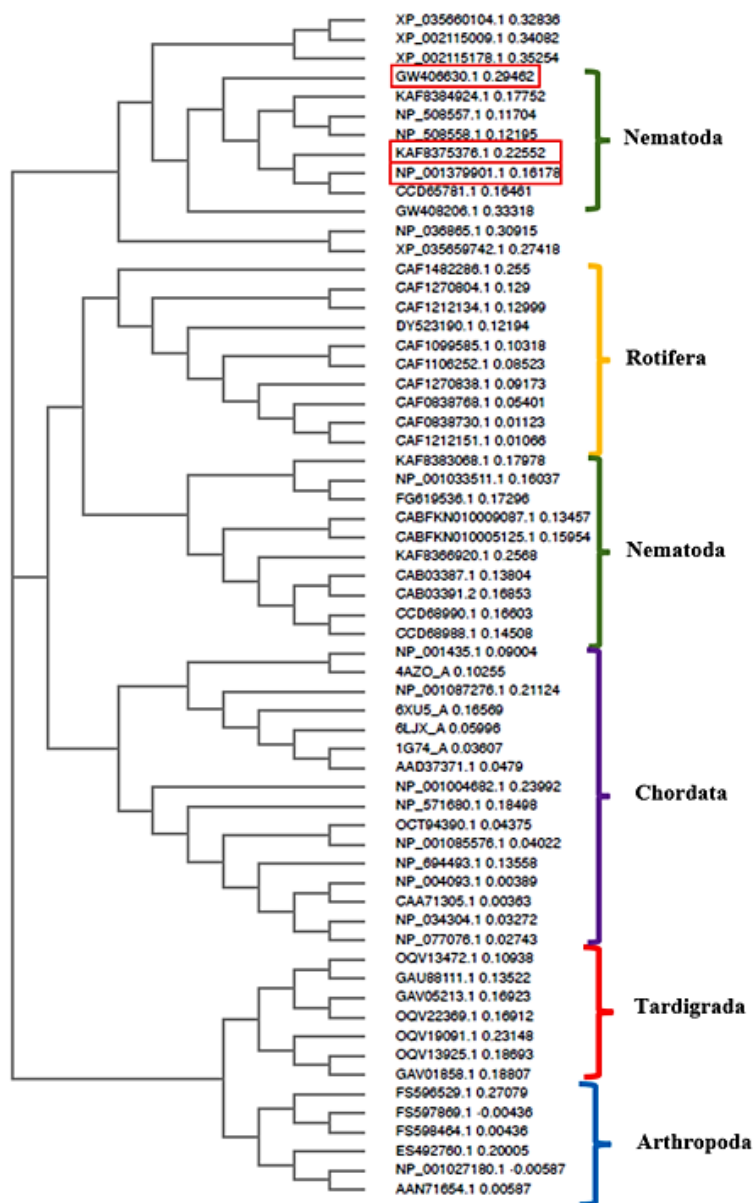


Figura 24. Cladograma das proteínas FABPs. Cladograma construído a partir das sequências homólogas às LBP de *C. elegans*. Triângulos vermelhos indicam a proteína LBP-3.

8.10 Apêndice J – Sequências primárias das FABPs de espécies não anidrobiontes.

6LJX_A

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMADAFVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVGFATRKVA
GMAKPNMIISVNGDVITIKSESTFKNTEISFILGQEFDEVTADDRKVKSTITLDGGVLV
HVQKWDGKSTTIKRKREDDKLVVECVMKGVSTRVYERA

NP_004093.1

MVDAFLGTWKLVDKSNFDDYMKSLGVGFATRQVASMTKPTTIIKNGDILTLKTHST
FKNTEISFKLGVEFDETTADDRKVKSIIVTLDDGGKLVHLQKWDGQETTLVRELIDGKLI
LTLTHGTAVCTRTRTYEKEA

NP_001435.1

MATVQQLEGRWRLVDSKGFDEYMKELGVGIALRKMAMAKPDCIITCDGKNLTIKT
ESTLKTTQFSCTLGEKFEETTADGRKTQTVCNFTDGALVQHQEWDGKESTITRKLK
DGKLVVECVMNNVTCTRIYEKVE

CAA71305.1

MADAFLGTWKLVDKSNFDDYMKSLGVGFATRQVASMTKPTTIIKNGDILTLKTHST
FKNTEISFKLGVEFDETTADDRKVKSIIVTLDDGGKLVHLQKWDGQETTLVRELIDGKLI
LTLTHGTAVCTRTRTYEKEA

6XU5_A

GMSDKFLGTWKLVSSENFDDYMKALGVGLATRKLGNLAKPTVIISKKGDIITIRTEST
FKNTEISFKLGQEFEEETTADNRKTKSIVTLQRGSLNQQVQRWDGKETTIIKRKLVNGKM
VAECKMKGVVCTRIYEKVE

NP_034304.1

MADAFVGTWKLVDKSNFDDYMKSLGVGFATRQVASMTKPTTIIKNGDTITIKTQST
FKNTEINFQLGIEFDEVTADDRKVKSLVTLDDGGKLIHVQKWNGQETTLTRELVDGKLI
LTLTHGSVVSTRTRTYEKEA

4AZO_A

GSHMASLKDLEGKWRLMESHGFEEYMKELGVGLALRKMAAMAKPDCIITCDGNNIT
VKTESTVKTTVFSCNLGEKFEETTADGRKTETVCTFQDGALVQHQQWDGKESTITR
KLKDGKMIVECVMN NATCTRVYEKVQ

1G74_A

CDAFVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVGFATRQVAGMAKPNMIISVNGDLVTIRSEST
FKNTEISFKLGVEFDEETVDGRKVKSIITLDGGALVQVQKWDGKSTTIKRKR DGDKL
VVECVMKGV TSTRVYERA

NP_694493.1

MADAFIGTWNLKESKNFDEYMKGIGVGFATRQVANMTKPTTIISKEGDVFTLKT VST
FKSTEINFKLGEEFDETTADDRKVKSVITLDGGKLLHVQKWDGKETTLLREVSDNNL
TLTLTLGDIVSTRHYVKA E

NP_001004682.1

MVDK FVGTWKMTTSDNFDEYMKAI GVG FATRQVGNRTKPNLVVCVDEQGLICMKS
QSTFKTTEIKFKLNEPFEETTADDRKTTTVM TIENGKLVQKQTWDGKESTIEREVSD
GKLI AKCKMGDVVAVRTYVKEA

NP_571680.1

MVD AFCATWKLVD SQNFDEYMKSLGVGFATRQVGNVTKPTIVISHEGDKVVIKTLS
TFKNTEISFKLGEEFDETTADDRHVKSTVSLEGDNLVQVQRWDGKETK FVREIKDG
KMVM TLT FEGVQAVRTYEKA

NP_077076.1

MADAFVGTWKLVD SKNFDDYMKSLGVGFATRQVASMTKPTTII EKNGDTITIKTHST
FKNTEISFQLGVEFDEV TADDRKVKSVVTL DGGKLVHVQKWDGQETT LTRELS DGK
LILTLTHGNV VSTRTYEKA

NP_036865.1

MPVDFNGYWKMLSNENFEEYLRALDVNVALRKIANLLKPDKEIVQDGDHMIIRTLST
FRNYIMDFQVGKEFEEDLTGIDDRKCM TTVSWDGD KLQCVQKGEKEGRGWTQWI
EGDELHLEMRAEGVTCKQVFKKVH

AAD37371.1

MCDAFVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVGFATRQVAGMAKPNLIISVEGDLVVIRSES
TFKNTEISFKLGVFEFDEITPDDRKVKSIITLDGGVLVHVQKWDGKSTTIKRRXDGDKL
VVECVMKGVSTRVYXRAXAKGRGPGLKFASNSTIT

OCT94390.1

MEKFAGTWRLVDSKNFDEYMKALGVGFATRQIGNVTKPTTIISVDGDKIVVQTQSTF
KNTEVSFKLNEEFDEITADDRKCKSLVTLEDGKCLKHVQKWDGKETILIREVDGDKLV
LNLTFGDVASSRHYERA

NP_001085576.1

MEKFAGTWRLVDSKNFDEYMKAIQVGFATRQIGNVTKPTTIISLDGDKIIVQTQSTFK
NTEVSFKLNEEFNETTADDRKCKSLVTLEDGKCLKHVQKWDGKETTILIREVDGDKLV
LTLTLADVSSRHYEKA

NP_001087276.1

MVDQFVGSWKLTDSSQGFDEYMQSLGVGFATRQKAGAMAKPNVIISVNGDEILLKTES
SLKTTEVTFKLQGFDEQTADNRKTKTIITCDSGVLNQQVQKWDGKETTIQREIKNGH
LVVTCMAGDVKCVRTYEKMKKA

NP_001027180.1

MSFVGKKYKLDKSENFDEYMKELGVGLVTRKMGNSLSPTVEVTLEGDTYTLTTTST
FKTSAISFKLGVFEFDEETLDGRNVKSIITLDGNKLTQEKGDKPTTIVREFTDNELITT
LTIGNVKCVRVYKAV

AAN71654.1

TSCAEHRPNIPKMSFVGKKYKLDKSENFDEYMKELGVGLVTRKMGNSLSPTVEVTL
EGDTYTLTTTSTFKTSAISFKLGVFEFDEETLDGRNVKSIITLDGNKLTQEKGDKPTTI
VREFTDNELITTLTIGNVKCVRVYKAV

XP_035659742.1

MPVDLSGTWKLDSSENFEEFMKKLEVNLMALRKMALAKPTTEITQTGNHFVVKTST
TFKNTVVEFDIDQEFDEKTADDKEVKSVAWTDGDKLVVTQKRGPPIGDVLYIRELQG
DDALLTCTAGDVVCKRHYKSK

XP_035660104.1

MADDSIAGKWKLD RSENFEEFLEEMGAPWIARKAAAKSSPTQEIIINGDQIEIKISSIM
STNIMKFTIGTEFESEWAKNKSKAIANWEDGKLV LKENGANGEIVTTRHVEGGELM
MILNTPKGVVCKRIFKKSE

KAF8366920.1

MAAEKFIGRWNSASSEN FEEYMKECGVGLLTRKAAANIKVTLEFKKQGNKWVCAQ
ESTFKNTSLEFELDKEFEETTPDGRKYLT LVTITPEGKFIQRQKKIKDGDKDSTITRHV
DDNDILNVVMECGSIVCKRITYTRQK

KAF8375376.1

MRLGLLLFCLAVSVSASSIPEKFFGRFKIDRSENFDEF LSAKGVGFITRQLIKLASVT
KVFAKGAEAGTYVYENLSSKKDVKYTFKLGEQFTA EGLDSTQHEITFDVKGDEVTE
HHKRVGNPDVSPETYHYTISEDNSELIMTMTNNGITCKRFLKRE

KAF8383068.1

MADQFIGKWNNTTSDNF DAYLKEVGVGMVTRTVASKLKPTLT FEVNGDDWTMTSI
STFKTHVTKFKLGEFEDKTIDGREVTSKFELDGTKLIQTEKGKSEGKDSRIERSISG
NTLTINMECNGVKSVRVYEKA

KAF8384924.1

MRLLLSSLLLLSIGLVVSANTSLPDKFYGKFTLDHSENFDEYLEAKGYGWFTRKLVTL
ATFEKVFTKGAGSTFDYENLTTKKNVAYKGVTLGKEFEGEGLDSEKHKITFYMKGD
KLFEKHVPVNKSGEAK EEEY EYFDGDFLLVKMEANGVIGKRFYKRVTA

CAF1270838.1

MASSDVEGLKGSWNYADGENFDEYMKEIGVGLTSRLAAKSIKPRLIISENGGKWTV
RSESTIKTTSYEFTPGVEFDETTDPDGREVKSTINFKGNKWWHTAVDKNGKESVVTR
YVDDKGRHMIDMECGSVKARRWYQRAE

CAF1270804.1

MANTGIEALKGSWDHVDDDNFDEFMKELGVGWTIRMAAKAVKPHLIINENNGKWA
KSESTFKTVFYEFTPGVEFDETTDPDGRQVKTTITFEGNKWTSTTIDKNGKKSIVTRY
VDDNGQQMIEMECGSVKARRWYKRVQ

CAF1482286.1

MASADSDIQMLKGTWDYVDGENFDEYLKEAGISWVLRQAAKAVTKEKMIISADNNG
KWTLKSESTLKNTVYEFTPGVFEFNETRADGAEVKSTITFDNNTSRWIHNAIDKQGKL
VHIERYVDDKDKQQVELTCGNVKARRRYKRVG

CAF1099585.1

MDSSGVQGLKGSWDYVDGENFDEYMKELGVGWALRLTAKGVKPRLIISEANGKW
TVRSESAIKTVIYEFTPGVGFDETTDPDGREVDSTISFEGNKWIHTSIDKSGKKS
VTR FIDENGQQMIHLECNSTKARRWYKKVD

XP_002115178.1

MAEKNVIGKWKLVRSDENFENYMTQIGIGKVGRAWRKKYKPTQIIVKLGNKMAIRTT
NGLFVNLAEFELGEELTEKTVKGEVVKTTYTFEGDDEQTLTSTSNKSKHILKTERV
VEGSEMVHTLTICDIVCKRYKVKVGEAPPFKVIKPKPGSADAPASEHDANEEKEDQ
ED

XP_002115009.1

MATFSSDNPICGKWKLDHSENFEEYLKAAGVGAIKRQLAKRTSHIEQTIKCLDGNKV
AIKIWSRVLTKEPTYVIDEAIDEETLEGEKVKGTMTFDGKLTNTMAGTKKSPAYTIR
YIEGDNLVHEFHYSGTTCKRFYNRME

8.11 Apêndice K – Sequências primárias das FABPs de espécies anidrobiontes.

NP_508557.1

MCAKIALLLVLVGAASAAPVLPDKFYGTFDLHDSENFDEYLTAAGYGFTRKLVTFAT
FKKVFTKTSNKNLFDYSNLTSKKDVHYKNVQLGKAFQGEGLDSTKHEITFLKDGHL
FEHHKPLEGGDAKEETYEYLFDKFLLVRMSFNGVEGRRFYKRLP

NP_508558.1

MSSKFLILLAFCGATLVAAEQLPEKFGTFDLHDSENFDEYLTAAGYGFTRKLVTF
ATFKKVFANKNKNLFDYSNLTSKKDVHYKNVQIGSKFEGEGLDNTKHEVTFTLKDG
HLFEHHKPLEEGESKEETYEYFDGDFLIQKMSFNIEGRRFYKRLP

NP_001379901.1

MNLYLTLFSFCFLAIMAEAASEIPEKFFGKYDLDRSENFDEFLLAAKGVSWFVRQMIK
LAKVSKVLAKNETPGKYNMENLTSKNTLYHGWELGKTFEAEGLDGVAHKITFSFK
DGVLSEHHIRLNDPEHSAETYYTIENDQLVMKMNNGITCRRWFKRSTGKK

CCD65781.1

MSVPDKFFGRYQLDKSENFDEFLLSSKGVNWFVRQMIKLAGLTKIISQNQEAGKYNM
ENLTSKNTNYQAWELGKKFEAPGLDGNQHEITDFDKDEILSEHHIRLNEPETAET
YFYTIDDQNQLVMRMENNGIVCRRWFKRVEQK

CCD68990.1

MSAEQFVGRWKLVESENFEDYLKEVGVGLLLRKAACAAPKPTLEIKVNGNKWHVNO
LSTFKNTTLEFTLGVEFDETPDGRQFKSTITIEDGKVVHVQKRIKDSHDSDVITRWF
EGEKLITTLQSGSVISRRAYIRE

CCD68988.1

MSQEFVGRWKLHSENFEEYMKEVGVGLITRKAANLKPPTLEIKVEGDLWYSNQYS
TFKNTTSLFKLGQEFDETPDGRVKSVMNFENGKFIHQKIKDSKESIITRWLEG
DKLITTLESGSVSRREYVRE

CAB03387.1

MASMNDFIGRWKLVQTFENFDEYMKEIGVGLITRKAANLKPPTLEIKVEGDLWYSNQYS
STFKNTKLSFKLGEEFVENSPPDRTYNSLFTFENGKLTQRQNKIKENHKSSVLTTWL
ENGLIQTYSQSGDVICRREWERE

CAB03391.2

MVSMKEFIGRWKLVHSENFEEYLKEIGVGLLIRKAASLTSPLEIKLDGDTWHFNQY
STFKNNKLAFKIREKFVEIAPDERSYNTLVTFENGKFISHQDKIKENHHSSVFTTWLE
NGKLLQTYQSGSVICRREFVKE

NP_001033511.1

MLSAFFKTAHCALRNMPIQTDLVGKWNFVSSSENFDEYLKEVGVGWAIRTIATKTKPA
LEFAVNGDEWTMNSNSTFKNYTLKWKLTASDEKTADGRDVSSVFSIENDHLVQIE
TGKGGGKDSRIERYIENGKLVIVCTCNGVKCTRVEKAA

OQV13925.1

MADQFIGNFELVSSDNFDKYMEAIGVGFLLRKVANSQKTAQVEITKNGDQYNIKTITS
VKTIEVKFKLNEEFKEATLDGREVNTTFTVEGNVLRQTQRGIKDKDFVSTIDRQITPE
GFDATIKYKDVTA VRKYKRN

OQV13472.1

MATPVADITGRWDLHSSEGFEDYLKAVGVNFVLRKLCISASTLEITKEGDTYTLKTI
SSMKTIVETKFKLNEEFDDKLMGREGCQLFTLDGNVLKTRQKTKDGFETTIEREITP
EELKTTIRYKDVVCKRNFRAAA

OQV19091.1

MADITGKYSLESSENFDEYMQSIGVGFLKRKAASALSTAVVDITKTGPDAYVLKTTTT
LKTTELPFVLNKEVPETTIDGREVKALFTLDGNILKQKQTGADGFESTIDREFTPTGLI
ATLYHKNVTAVRKYKKV

OQV22369.1

MADITGTYKLTSSSEHFDDYLKAVGVNFILRKLATTVESATVEITKNGEETIKTTTAVK
SAEIKFKLGEPFTEHTMDGRDVETTFTLEGNLLKQVQHDIKGGFDSFSDREFNGDE
LITTMRCKDAVAVRKYKKE

GAU88111.1

MDSKVETADITGRWDLYNSEGFEDYLKAVGVNFILRKLISRMAASTLEITKDGDEYT
MKTISSMKTIVETKFKLDQEFDDKLMGREGCRTLFLVDGNVLKQRQRTPDGFETNVE
REVTKEEVITTIRYKDVTCVRKFRKTAT

GAV05213.1

MAQQNVDITGLYKLTSSSENFDEYLKAVGVSWALRTAVKALGSVGSATVEITKIGQDE
YSIKTVTSIKQAEIKFKLGQEFVEKTL DGRDVNTTFTLTGNTLKQTQKDPKGDFQTTV
DRDFVGDDEMTTMMRAKDVVCVRKYHKEPKA

GAV02867.1

MSVDITGKYQMHSQNFDEFLKAVGLSLLKRKLASAMEVATVDITRSGSTYTIRTTT
PLKTHEVTFVLGMTMHETTIDGREVQV

GAV01858.1

MTVEGVYTSAAAFSRQTLGPVTFSLVFPLYCKLISANKMADKILGTYDLVESKDFDK
YMEAIGVGFLMRKMANSTTSMQVEISQNGDDFTIKSISKLKTSEVKFKLNQETKETT
MDGREVLSTFTLDGNTLTQVQKGKIDPSFVSTIERKFTSEGMVATLKHKDVAVRTY
KKI

CAF0838768.1

MTSSGCDGLKGTWDYVDGENFDEYMKELGVGMATRLAAKGVKPRLVISENGGKW
TVRSESIKTTSYEFTPGVEFNETTPDGREVKSTISFEGNKWVHTSVDKNGKKS SVT
RYVDDKGQQMIDMECGSVKARRWYKRA

CAF0838730.1

MAGVEALKGRWDYVDGENFDSYMKEIGVGMATRLAAKGIKPRLIISEDGGKWT VRS
ESSIKTVSYDFTPGVEFNETTPDGREVKSTISFEGDKWVHTSVDKDGKKS SVTRYV
DDKGQQMIDMECGSVKARRWYKRAE

CAF1212134.1

MTSGSIQALKGTWDYVDSENFDEFMKELGVGWAIRMAAKGVKPRLVISENDGKWN
IKSESTFKTVAYDFTPDVEFNETTPDGREVTTVIHFHGDKWWNVSIDKNGKKS VITRY
VDDKGQQMIDMECGSVKARRWYKRAS

CAF1212151.1

MAGVEALKGRWDYVDGENFDNYMKEIGVGMATRLAAKGIKPRLIISEDGGKWT VR
SESIKTVS YDFTPGVEFNETTPDGREVKSTINFEGDKWVHTSIDKDGKKS SVTRYV
DDKGQQMIDMECGSVKARRWYKRAE

CAF1106252.1

MDSSGVQGLKGSWDYVDGENFDEYMKELGVGWALRMTAKGIKPRIIIEAGGKWT
LRTESAIKTVTYDFTPGQEFDETTDPDGREVKSTINFEGNKWVHTSIDKNGKKS
VTR
YVDDKGQHMIEMECGSVKARRWYKRAE

ES492760.1

MAVTGKFKLVSSNFDEYMKAIGVGFATRKIANSLSPTVEISVNEEGEYTLKTSSTFK
TSEIKFKLGEEFDEERQDGKKVKSTVTKEGNKLTHVMKADDPSTITREVNGDEMK
TILTVDDVVCTRLYKRVD

FS597869.1

MAWEGKKYKLDQRQENFEEYMKKIGVGMVLRKMGMSVHPTVYLVKDGDEYSFHTD
STFKNTVMKFKLGEEFENETLDGRKVQTVITIDGNTMTQVEKGEKKSIVREFSDSE
VVVTCEYDGVVSKRWYKVV

FS596529.1

MSIVFNKKYKLDQRSENFDEFKELGVNYLIRKMANSTTSTVELVKLDDETYSFNTTST
FRSQELKFKLNEEFTEKRMDGAEVKSTITFEGNKMIQRQKGDKEIVLERVFTQDELIL
TCTVNNVVAKRWFKA

FS598464.1

MKKIGVGMVLRKMGMSVHPTVYLVKDGDEYSFHTDSTFKNTVMKFKLGEEFENET
LDGRKVQTVITIDGNTMTQVEKGEKKSIVREFSDSEVVVTCEYDGVVSKRWYKVV

DY523190.1

MAASAGVEGLKGSWDYVDGENFDDYMKELGVGMMMRMTAKGIKPRLVISQNGDK
WTVRSESIKTTSYDFTPGVTFDETTDPDGREVKSTINFEGNKWVHTTVDKNGKQSV
VSRFIDANGHHMIDLECGKVKARRWYKRVE

FG619536.1

MMVRTVASKLKPTLEFIVNGDEFTMTSVSTFKTIVVKWKLGEEDDKTGDGREVTQ
LFTIENDRLIQIEKGKNGGKDSRIERYIEGGLLIIVCECNGVKCTRKYEKST

CABFKN010009087.1

MASEFAGKWDFESSENFDEYMKAVGVGLITRQVANNKPTLVFEINGDHWTIKSLS
AIKNVTVEFELDKFEETTGDGRKVMVSNNFYL

CABFKN010005125.1

MAQEFAGNWNFESSDNFDEYLKAVGVGLITRKVAANLKPQIVIKVDGDHWRLESNS
TFKNIVVEFDLGKEFEETTGDGRKVMVSNVLISHCVVSVDI

GW406630.1

MLYAKILSLIVLIFAVSTVEMSSEIPENFLGKFKLDKSENFDAYLETKGLNWFLRKIICL
SSVTYVFKKGSEPGKYTCVVHSKKTIEYPDWKIGEMFEGEGMDGTKHKITFTMPND
NTLDEHHDRYQIEGDNQELYHYTREGDYLVQTMSNKGVTAKRWHKLV

GW408206.1

MKLSILFVFAIIGFAAYASAEDFPQEFLGSWSVGKSENLDEYLTEKGYGWFTRQLVK
AASITKTFTRTESGRFTAKVETTKKDVEWVNVNPFNEYFEGDYVDGGKHKMKFYEN
GALFEDHKPVDTTGEAKAELYKYEKDGANSMIMYMTANGVTAKRWYNKN

8.13 Apêndice L - Aminoácidos mais conservados em um grupo em relação ao outro.

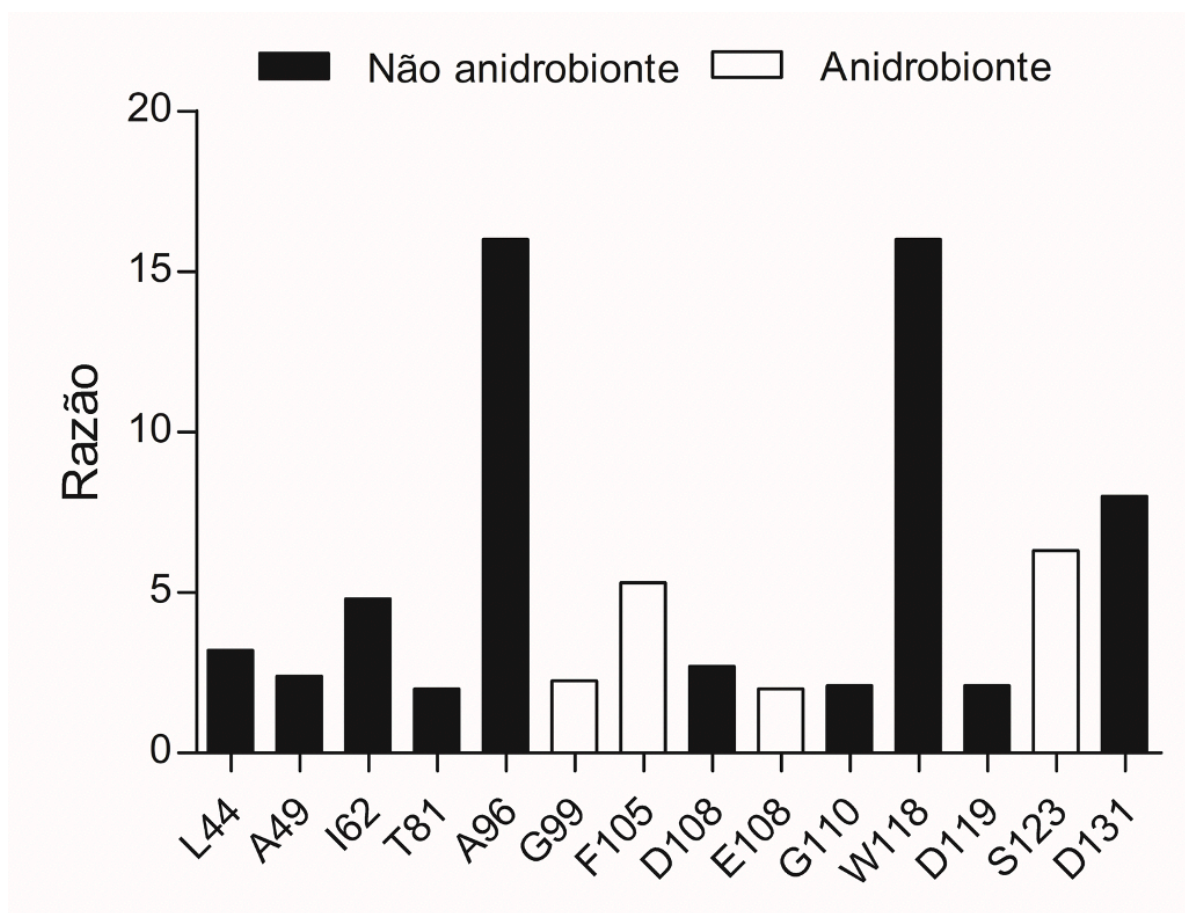


Figura 25. Razão entre os aminoácidos mais conservados em um grupo em relação ao outro. Estão apresentados os aminoácidos mais conservados em um grupo em relação ao outro para as FABPs (razão $\geq 2,0$). As barras em preto representam aminoácidos mais enriquecidos no grupo não anidrobionte, e em branco representam aqueles enriquecidos no grupo anidrobionte. L44 – leucina com posição 44; A49 – alanina com posição 49; I62 – isoleucina com posição 62; T81 – treonina com posição 81; A96 – alanina com posição 96; F105 – fenilalanina com posição 105; D108 – ácido aspártico com posição 108; E108 – ácido glutâmico com posição 108; G110 – glicina com posição 110; W118 – triptofano com posição 118; D119 – ácido aspártico com posição 119; S123 – serina com posição 123; D131 – ácido aspártico com posição 131.

8.13 Apêndice M – Resultado da busca no PDB.

Tabela 6. Retorno da busca no pdb utilizando LBP-3 de *C. elegans* como isca.

ID PDB	Espécie	Ptna	Identidade vs <i>C. elegans</i>	E - value	Resolução
6I8X	<i>Ascaris suum</i>	As-p18	47%	2,17E-34	2,3 Å
6I9F	<i>Ascaris suum</i>	As-p18	47%	2,17E-35	-
5HZ8	<i>Homo sapiens</i>	FABP4	26%	5,78E-08	1,12 Å
2A0A	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Der f 13	31%	4,19E-06	-
4LKT	<i>Homo sapiens</i>	FABP5	27%	5,68E-06	2,57 Å
1JJJ	<i>Homo sapiens</i>	E-FABP	27%	5,68E-07	-
6C1Z	<i>Caenorhabditis elegans</i>	LBP-8	24%	1,04E-05	1,3 Å
4LKP	<i>Homo sapiens</i>	FABP5	27%	5,68E-06	1,67 Å

8.14 Apêndice N – artigos selecionados.

Tabela 7. Artigos descrevendo aminoácidos com função estrutural em FABPs.

Autor	Artigo
Esteves & Ehrlich, 2006	Molecular evolution of vertebrate fatty acid-binding proteins
Baisong et al., 1997	Secretion of a novel, developmentally regulated fatty acid-binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, <i>Ascaris suum</i>
Ibáñez-Shimabukuro et al., 2019	Structure and ligand binding of As-p18, an extracellular fatty acid binding protein from the eggs of a parasitic nematode
Ibáñez-Shimabukuro et al., 2014	Resonance assignment of As-p18, a fatty acid binding protein secreted by developing larvae of the parasitic nematode <i>Ascaris suum</i>
Li et al., 2014	Concerted dynamic motions of an FABP4 model and its ligands revealed by microsecond molecular dynamics simulations
Floresta et al., 2017	Adipocyte fatty acid binding protein 4 (FABP4) inhibitors. A comprehensive systematic review
Babin, 2009	Molecular evolution of vertebrate fatty acid-binding proteins
Storch & McDermott, 2008	Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins
Marr et al., 2006	Expression, purification, crystallization and structure of human adipocyte lipid-binding protein (aP2)
Liou & Storch, 2001	Role of surface lysine residues of adipocyte fatty acid-binding protein in fatty acid transfer to phospholipid vesicles
Chen et al., 2020	Molecular mechanism with regard to the binding selectivity of inhibitors toward FABP5 and FABP7 explored by multiple short molecular dynamics simulations and free energy analyses
Gutiérrez-González et al., 2002	Solution structure and backbone dynamics of human epidermal-type fatty acid-binding protein (E-FABP)
Hohoff et al., 1999	Expression, purification, and crystal structure determination of recombinant human epidermal-type fatty acid binding protein. <i>Biochemistry</i>
Zimmerman & Veerkamp, 2002	New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins.
Constantine et al., 1998	Backbone and side chain dynamics of uncomplexed human adipocyte and muscle fatty acid-binding proteins
Veerkamp et al., 1999	Structural and functional studies on different human FABP types
Hunter et al., 2018	Molecular dynamics simulations of apo and holo forms of fatty acid binding protein 5 and cellular retinoic acid binding protein II reveal highly mobile protein, retinoic acid ligand, and water molecules
Tillman et al., 2019	Structural characterization of life-extending <i>Caenorhabditis elegans</i> Lipid Binding Protein 8
Zimmerman et al., 1999	Functional and conformational characterization of new mutants of heart fatty acid-binding protein

8.15 Apêndice O– descrição da função estrutural dos aminoácidos descritos na literatura.

Tabela 8. Descrição da função de aminoácidos divergentes entre os grupos.

Modelo	Proteína	Aminoácido	Posição alinhamento	Função	Referência
Invertebrados	FABPs	G47	45	100% identidade entre FABPs	Esteves et al. 2006
	FABPs	G29, N38, F39, 61P, G70, K83, 93G, 96F, D102, R156, Y158	27, 36, 37, 59, 67, 79, 88, 91, 97, 147, 149	76% identidade entre FABPs	Esteves et al. 2006
	FABPs	R106, R126, Y128	127, 147, 149	Interação com grupo COOH do ligante	Esteves et al. 2006
	As-p18	K43, R138, Y140	55, 147, 149	Interação com grupo COOH do ligante	Ibanez et al. 2019
<i>Ascaris suum</i>	As-p18	A48, A49, S50, G51, L52, P53, D54, R55	65-69	Inserção de resíduos de cadeia lateral positiva em nemFABPs ($\beta\beta$ - β C)	Ibanez et al. 2019
	As-p18	V107, D108, D109, P110, W111, D112	124-130	Inserção de resíduos de cadeia lateral negativa em nemFABPs (β G- β H)	Ibanez et al. 2019
	As-p18	D5-F7	23-25	Hélice 3-10 característico das FABPs de subfamília IV	Ibanez et al. 2019
	As-p18	W30, I31, V35, L38	49, 50, 53, 56	Motivo dedo de zinco	Ibanez et al. 2019
Camundongo	FABP4	C117	138	Regula a entrada do ligante no portal	Li et al. 2014
	FABP4	F57	78	Como "chave" do portal exposto (aponta para fora) ou não (aponta para dentro) o ligante ao so	Li et al. 2014
	FABP4	W29	50	Em contato com F57 determina conformação fechada da proteína	Li et al. 2014
	FABP4	F16, R106, C117, R126, Y128	25, 127, 138, 147, 149	Posicionamento do ligante próximo ao fundo da cavidade	Li et al. 2014
H. sapiens	FABP4	F16	25	Posicionamento do ligante próximo ao portal	Li et al. 2014
	FABP4	K21, K31	42, 52	Resíduos básicos fundamentais para transferência por colisão	storch et al. 2009
	FABP4	D17, D18, K21, R30	38, 39, 42, 51	Resíduos necessários para interação com Lipase hormônio sensível	storch et al. 2009
	FABP4	K21, R30, K31	42, 51, 52	Formam um sinal de localização nuclear	storch et al. 2009
Roedor	FABP4	L66, L86, L91	87, 107, 112	Formam um sinal de exportação nuclear	storch et al. 2009
	FABP4	R126, Y128	147, 149	Ligações de hidrogênio com grupo COOH do ligante	Marr et al. 2006
H. sapiens	FABP4	F16, M20, F57	25, 41, 78	Resíduos hidrofóbicos, realizam interações de Van der Waals com o ligante	Marr et al. 2006
	FABP4	K32, K59	52, 79	Altera taxa de transferência de Acido gráxo através da membrana	Liou & Storch. 2001
H. sapiens	FABP5	C43, 47, 67, 87, 120, 127	61, 65, 85, 105, 138, 145	Ponte de sulfeto entre C120-127	Gutiérrez-González et al. 2002
	FABP5	Hidrofóbico 4, hidrofílico 5, Hidrofílico 6, F7	22-25	Subfamília IV	Gutiérrez-González et al. 2002
	FABP5	L7, F65, C67, C87, F89	25, 83, 85, 105, 107	Menor estabilidade estrutural	Gutiérrez-González et al. 2002
	FABP3	F4, I62, F64, V84, L86	25, 83, 85, 105, 107	Maior estabilidade estrutural	Gutiérrez-González et al. 2002
H. sapiens	FABP5	L60, V118	78, 136	Menor energia de ligação com ácido graxo	Gutiérrez-González et al. 2002
	FABP3	F57, L115	78, 136	Maior energia de ligação com ácido graxo	Gutiérrez-González et al. 2002
	FABP5	R109, R129, Y131	127, 147, 149	Ligações de hidrogênio com grupo COOH do ligante	Hohoff C et al. 1999
	FABP5	F19, M23, L32, M35, G36, V118	37, 41, 50, 53, 54, 136	Interações de Van der Waals	Hohoff C et al. 1999
C. elegans	FABP5	L60	78	"Chave" do portal apontando para fora	Hohoff C et al. 1999
	LBP-8	Y22	40	Sítio de fosforilação	Hohoff C et al. 1999
	LBP-8	R81	99	Diferença estrutural	Tillman et al. 2019
	LBP-8	K24, R33, K34	42, 51, 52	Formam um sinal de localização nuclear	Tillman et al. 2019
C. elegans	LBP-8	25-IGVGLLI-32	44-50	Resíduos hidrofóbicos, sugerindo FABP de interação com membrana (colisão)	Tillman et al. 2019
	LBP-8	F19, F60, L65, F67, F73, F94, F110, T112, F134	37, 78, 83, 85, 91, 112, 125, 127, 149	Resíduos hidrofóbicos, realizam interações de Van der Waals com o ligante	Tillman et al. 2019
	LBP-8	Q56, Q121, Y123, R132	74, 136, 138, 147	Ligações de hidrogênio com grupo COOH do ligante	Tillman et al. 2019
	LBP-8	F134	149	"Prejudica" a interação com o grupo COOH do ligante	Tillman et al. 2019
LBP-8	T112	127	Reduz a força de atração eletrostática com o grupo COOH do ligante	Tillman et al. 2019	

Destacados em azul encontra-se a função descrita para os aminoácidos indicados pelos triângulos vermelhos no alinhamento.

8.16 Apêndice P – Predição da formação de pontes de sulfeto.**Tabela 9.** Predição de ponte dissulfeto em LBP-3 de *P. superbus*.

Posição (AA)	Distância (AA)	Ponte dissulfeto	Score
59	19	LRKII <u>C</u> LSSVT-PGKYT <u>C</u> VVHSK	0.4
78			

AA: Aminoácido

8.17 Apêndice Q – Artigos publicados durante o doutorado.

RODRIGUES, Jhennyfer Aline Lima et al. β 2 adrenergic interaction and cardiac autonomic function: effects of aerobic training in overweight/obese individuals. **Eur. J. App. Physiol**, v. 120, n. 3, p. 613-624, 2020.

DE ARAÚJO RIBEIRO, Yasmin et al. Origami de DNA: uma nanotecnologia baseada em ácidos nucleicos. **Genética na Escola**, v. 15, n. 2, p. 98-107, 2020.

CONTILIANI, Danyel Fernandes et al. tolerates hypoxia within Gallium metal cage: implications for the understanding of the phenomenon of anhydrobiosis. **J. Nematol**, 2020.

MORAES, Vitor N. et al. Relationship between the hsa miR 150-5p and FTO gene expression in white subcutaneous adipose tissue with overweight/obesity, lipid profile and glycemia. **An. Acad. Bras. Cienc**, v. 92, 2020.

CONTILIANI, Danyel Fernandes et al. O gene TPS1 e seu papel na anidrobiose. **Genética na escola**, v. 16, n. 1, p. 142-149, 2021.

CONTILIANI, Danyel Fernandes et al. A distinct molecular signature on anhydrobiotic cyanobacterial metallothioneins. **Res. Soc. Dev**, v. 10, n. 2, p. e50610212714-e50610212714, 2021.

TRAPE, Atila Alexandre et al. NOS3 Polymorphisms Can Influence the Effect of Multicomponent Training on Blood Pressure, Nitrite Concentration and Physical Fitness in Prehypertensive and Hypertensive Older Adult Women. **Front. Physiol**, v. 12, p. 566023, 2021.

DE ARAÚJO RIBEIRO, Yasmin et al. Lsdia1: um gene envolvido na quiralidade de moluscos. **Genética na Escola**, v. 16, n. 2, p. 316-323, 2021.

CONTILIANI, Danyel Fernandes et al. MicroRNAs in prion diseases—from molecular mechanisms to insights in translational medicine. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1620, 2021.

8.18 Apêndice R – Artigo submetido referente a tese.

MORAES, Vitor N. et al. Effect of fatty acid diets on *Panagrolaimus superbus* anhydrobiosis. **Chem. Biodivers**, 2022.

Chemistry and Biodiversity <em@editorialmanager.com>

para mim

11 de nov. de 2022 15:54 ☆ ↶ ⓘ

Manuscript number: cbdv.202201062

Title: "Effect of fatty acid diets on Panagrolaimus superbus anhydrobiosis"

Dear Mr de Moraes,

This is to inform you that the above-mentioned Research Article has just been submitted to Chemistry and Biodiversity by Dr Tiago Campos Pereira including Vitor Nolasco de Moraes; Danyel Fernandes Contiliani; João Renato Carvalho Muniz; Yasmin Araujo Ribeiro; Tiago Campos Pereira and you are listed as a co-author. Please contact the submitting corresponding author for status updates.

This journal offers a number of license options; information about this is available here:
<https://authorservices.wiley.com/author-resources/journal-authors/licensing/index.html>

The submitting author has confirmed that all co-authors have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co-author's funder policies. If any author's funder has a policy that restricts which kinds of license they can sign, for example if the funder is a member of Coalition S, please make sure the submitting author is aware.

Yours sincerely,
Editorial Office Staff

Chemistry & Biodiversity
Wiley-VHCA
Seefeldstrasse 69
Postfach
CH-8024 Zürich
e-mail: chembiodiv@wiley.com

<http://www.cb.wiley.com>
<http://wiley-vhca.ch>