

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Biologia

db-secretaria@ffclrp.usp.br

USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**“Análises do silenciamento de genes LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) em
Panagrolaimus superbus: efeitos no desenvolvimento, morfologia e comportamento”.**

Gustavo Borges

**Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

“Análises do silenciamento de genes LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) em *Panagrolaimus superbus*: efeitos no desenvolvimento, morfologia e comportamento”.

Gustavo Borges

**Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

Nome do orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

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.

Borges, Gustavo

Análises do silenciamento de genes LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) em *Panagrolaimus superbus*:
efeitos no desenvolvimento, morfologia e comportamento / Gustavo Borges. Ribeirão Preto: USP, FFCLRP, 2013.
Ix, 53 f. : il. color.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Universidade de São Paulo, Curso de Ciências Biológicas, 2013.

1. Anidrobiose. 2. Interferência por RNA (RNAi). 3. *Panagrolaimus superbus*. 4. Proteínas LEA. I. Pereira,
Tiago Campos. II. Universidade de São Paulo. Curso de Ciências Biológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PARECER

O trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas que se intitula “**Análises do silenciamento de genes LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) em *Panagrolaimus superbus*: efeitos no desenvolvimento, morfologia e comportamento**”

O aluno foi aprovado e obteve a nota ()

Ribeirão Preto, 21 de Novembro de 2013 .

Prof. Dr. Tiago Campos Pereira
Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
(Orientador e Presidente da Banca Examinadora)

Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães
Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
(Membro Titular da Banca Examinadora)

Me. Paula Takahashi
Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
(Membro Titular da Banca Examinadora)

Prof. Dra. Marcia Maria Gentile Bitondi
Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
(Membro Suplente da Banca Examinadora)

Me. Liliane Maria Fróes de Macedo
Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
(Membro Suplente da Banca Examinadora)

Aos meus pais, Orlando e Fatima,
que sempre me apoiaram em todas as situações.
Obrigado!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Tiago Campos Pereira, por ter me aceitado em sua equipe e também pelas oportunidades ímpares que me foram dadas até este momento.

Agradeço à FAPESP pelo suporte financeiro recebido durante a realização desse trabalho (Processo nº 2012/06441-6).

Agradeço aos colegas de laboratório (antigos e atuais): Giovana (Macabéa), Thaís (Amiga), Lorena (Pikachu), Gabriel (Baioneta) e Tiago pela convivência sadia e harmoniosa durante todo esse tempo.

Agradeço também à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, em especial ao Departamento de Biologia, por ter me proporcionado toda estrutura e suporte durante o período da Graduação.

Agradeço também à Prof. Dra. Maria Helena Goldman e ao pessoal de seu Laboratório por todo auxílio e estrutura que nos foram dados durante o percurso desse trabalho.

Agradeço ao Daniel Marconato (Tio Dani), professor durante meu Ensino Médio que contribuiu de forma decisiva na minha escolha pela Biologia.

Agradeço à 47ª Turma de Biologia, especialmente: Henrique (Gugu), Fernando (Maomé), Vinícius (Pé-de-pano), Caio (Purtuga), Patrick (Fresno), Eduardo (Pinky), Maurício (Yoshi), aos Andrés (Fraldinha e Biscoito), Marcelo (Celão), Julia (Tralalá), Paola (Gastrite), Priscila (Tilápia), Paula (Palito), Bruna (Dina), Flávia (SuaMãe), Letícia (Bilau), Lenisa (Conga), Carolina (GPS) e Gabriela (Gabi) pelos momentos de descontração, alegria, desespero e tudo mais que passamos ao longo desses 4 anos. E que venham mais quatro.

Agradeço especialmente à Cláudia (Madre), com quem passei a maior parte do tempo no Laboratório, pela paciência neste período e por todo conhecimento compartilhado (além de um Super Pancho) e que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço à Lara por estar tão presente em minha vida ultimamente, me aturando nos momentos estressantes com carinho e me fazendo uma pessoa melhor.

A anidrobiose, do grego “vida sem água”, é um estado de organização biológica altamente estável que alguns organismos alcançam quando enfrentam um estresse hídrico severo. Estes organismos, ditos anidrobiotos, quando se encontram neste estado tornam-se resistentes a uma série de fatores: altas doses de radiação ultravioleta, raios X, temperaturas próximas ao zero absoluto, dentre outros.

Devido a esta capacidade destas espécies, uma nova área de pesquisa vem se desenvolvendo com a finalidade de tornar materiais biológicos resistentes à dessecação como ocorre nestes organismos, o que trará grandes avanços para medicina ao possibilitar o armazenamento a seco de órgãos, células, vacinas e outras moléculas de interesse.

Uma classe de proteínas conhecida como LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) é acumulada em resposta ao déficit hídrico em muitas plantas, cianobactérias e também alguns invertebrados, como alguns nematoides. São proteínas altamente hidrofílicas, termoestáveis e possuem uma grande plasticidade funcional, podendo atuar na proteção enzimática, estabilizando membranas e também atuando como uma espécie de escudo molecular.

O presente trabalho analisou a participação de três proteínas LEA na via de anidrobiose através do silenciamento gênico por Interferência por RNA (RNAi) e também buscou caracterizar os efeitos do *knockdown* na viabilidade, morfologia, desenvolvimento e comportamento do nematódeo *Panagrolaimus superbus*, nosso modelo de estudo. Os resultados obtidos confirmam a participação de LEA-12 no processo de anidrobiose, uma vez que seu *knockdown* não é letal em condições normais de umidade relativa, porém após o teste de dessecação os vermes LEA-12 silenciados exibiram uma redução na viabilidade. Adicionalmente, não houve nenhuma modificação na morfologia, comportamento e desenvolvimento e, portanto, podemos

inferir que LEA-12 participa exclusivamente do processo de anidrobiose, já que não foram observados efeitos pleiotrópicos.

Anhydrobiosis, from greek “life without water”, is a highly stable state of organization achieved by some organisms when exposed to severe hydric stress. These organisms, called anhydrobiotic, during the dry stage are resistant to various factors: high doses of ultraviolet radiation, X-rays, temperatures near to absolute zero, etc.

Due to this ability observed in these species, a new field of research has been developed aiming to convert biological samples into desiccation-tolerant ones, which would bring important advances for the medicine, like the possibility to store biological samples (organs, vaccines and other molecules of interest) in the dry state.

A class of protein known as LEA (Late Embryogenesis Abundant) is accumulated in response to the hydric stress in plants, cianobacteria and also in some invertebrates (like nematodes). The LEA proteins are highly hydrophilic, thermostable and display a great functional plasticity, acting in enzymatic protection, membrane stabilization and also as a molecular shield.

The present study analyzed the participation of three LEA proteins on the anhydrobiotic pathway through gene silencing via RNA interference. We also aimed to characterize the knockdown effects on viability, morphology, development and behavior on the nematode *Panagrolaimus superbus*, our model organism. The obtained result confirms the participation of LEA-12 on anhydrobiosis process since its knockdown was not lethal to the worms in normal conditions of relative humidity. However, after desiccation test, LEA-12-silenced worms displayed a reduction on viability percentage. Additionally, worms displayed no changes in morphology, behavior or development. Therefore, we can infer that LEA-12 participates exclusively on anhydrobiosis since no pleiotropic effects were observed.

ANOVA: análise de variância.

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*): programa de análises *in silico* que compara sequências nucleotídicas e/ou proteicas.

cDNA (*complementary DNA*): DNA complementar.

dsRNA (*double-strand RNA*): RNA de dupla fita.

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

GFP (*green fluorescent protein*): proteína verde florescente.

HT115 DE3: linhagem bacteriana defectiva em RNase III.

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactosídeo, composto indutor de transcrição genética.

L4440: vetor bacteriano para expressão de RNAs de dupla fita.

LB (*Luria Broth*): meio de crescimento para bactérias.

LEA (*late embryogenesis abundant*): proteína que é acumulada abundantemente na embriogênese tardia de sementes.

M9: solução tampão.

NaOH: hidróxido de sódio

NGM (*Nematode Growth Medium*): meio de crescimento de nematoides.

OP50: linhagem bacteriana.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): reação em cadeia da polimerase.

RH (*relative humidity*): umidade relativa.

RISC (*RNA-induced silencing complex*): Complexo de Silenciamento Induzido por RNA.

RNAi (*RNA interference*): Interferência por RNAi.

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase

siRNA: pequeno RNA interferente (“*small interfering RNA*”).

g: força de gravidade

v: volume

L: litros

mL: mililitros

mM: milimolar

px: unidade de medida pixel

w: peso (do inglês “weight”)

°C: graus Celsius

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ANIDROBIOSE.....	2
1.2 TIPOS DE ESTRESSE E RESISTÊNCIA.....	6
1.3 INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi).....	7
1.4 MODELO DE ESTUDO.....	9
1.5 PROTEÍNAS LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT).....	12
1.6 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.....	15
2JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 PLACAS DE MANUTENÇÃO.....	23
4.2 CLONES DE LEAs SELECIONADAS.....	23
4.3 PREPARAÇÃO DAS PLACAS DE INDUÇÃO.....	23
4.4 SILENCIAMENTO GÊNICO VIA RNAi POR ALIMENTAÇÃO (<i>feeding</i>).....	24
4.5 DIVISÃO DAS AMOSTRAS.....	24
4.6 CONFIRMAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO VIA RT-PCR.....	25
4.7 TESTE DE VIABILIDADE PÓS-SILENCIAMENTO.....	26
4.8 TESTE DE VIABILIDADE PÓS-DESSECAÇÃO.....	26
4.9 ANÁLISES FENOTÍPICAS.....	27
4.9.1 MORFOLOGIA.....	27
4.9.2 MENSURAÇÃO DA DIMENSÃO.....	27
4.9.3 COMPORTAMENTO.....	28
4.9.4 DESENVOLVIMENTO.....	28
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	29
5 RESULTADOS.....	30
5.1 TESTE DE VIABILIDADE PÓS-SILENCIAMENTO.....	31
5.2 TESTE DE VIABILIDADE PÓS-DESSECAÇÃO.....	31
5.3 ANÁLISES FENOTÍPICAS.....	33
5.3.1 MORFOLOGIA.....	33
5.3.2 MENSURAÇÃO DE OVOS E VERMES ADULTOS.....	33
5.3.3 COMPORTAMENTO.....	35
5.3.4 ANÁLISES DO DESENVOLVIMENTO.....	35
5.4 CONFIRMAÇÃO DO SILENCIAMENTO.....	36
6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONCLUSÕES.....	44
8 BIBLIOGRAFIA.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANIDROBIOSE

A água é reconhecidamente a matriz da vida e, portanto, sem ela qualquer forma de vida, hoje conhecida, é dependente em algum grau de água. No entanto, em 1702, Antony van Leeuwenhoek descreveu um fenômeno em que “animáculos” apareciam após a reidratação de amostras de musgos coletadas (Wright, 2001).

Posteriormente, outros pesquisadores também descreveram organismos com habilidades semelhantes à descrita por Leeuwenhoek. Neste período, era consenso que esses organismos se encontravam em um estado de repouso, porém no que se refere ao estado de organização biológica, nada era discutido.

Por volta de 1860, a comunidade científica inicia os debates sobre a condição biológica atribuída àqueles organismos secos, com interesse na, então, aparente descontinuidade metabólica. Várias eram as discussões e, até o fim do século XIX, poucos pesquisadores acreditavam na capacidade de sobrevivência à dessecação extrema de alguns organismos.

De acordo com Keillin (1959), anidrobiose é uma forma particular de criptobiose (do grego “vida escondida”). Esta definição abrange o estado de um organismo em que não se encontram sinais visíveis de vida e suas atividades metabólicas tornam-se praticamente imensuráveis ou reversivelmente paralisadas. O estado de criptobiose nada mais é do que uma adaptação particular contra estresses ambientais, e para cada fator que o induz dá-se uma denominação diferente: anidrobiose(induzida pela dessecação extrema), criobiose(induzida pelo congelamento), anoxibiose(induzida pela falta de oxigênio), osmobiose(induzida pela osmolaridade extremamente elevada) e termobiose(induzida por altas ou baixas temperaturas) (Keillin, 1959; Watanabe, 2006).

O termo “anidrobiose” foi cunhado por Giard em 1894, e refere-se a um estado específico de animação suspensa pelo qual alguns organismos de diferentes táxons entram por meio da dessecação extrema. Deve-se ressaltar neste ponto que organismos anidrobióticos possuem pouca água em seu interior quando estão no estado de animação suspensa – 0,1g de água/g de massa seca (Clegg, 1973; Billi e Potts, 2002), porém em quantidade insuficiente para a manutenção da hidratação das proteínas intracelulares, o que torna inviável a manutenção do metabolismo.

Normalmente um organismo sem metabolismo é considerado “morto”, porém em organismos conhecidos como criptobióticos essa suspensão do metabolismo é completamente reversível. A criptobiose, do grego “vida escondida”, pode então ser entendida como uma animação suspensa. Tendo isto em mente, o cientista David Keilin propôs um terceiro estágio de organização biológica, além do vivo e morto: o criptobiótico (Clegg, 2001).

Para que um organismo entre em animação suspensa, várias adaptações se fazem necessárias, como por exemplo o acúmulo de “solutos compatíveis” (Yancey *et al.*, 1982; Somero e Yancey, 1997). Entre eles destacam-se os dissacarídeos não-redutores, como trealose e sacarose, que promovem a proteção de macromoléculas e membranas frente à dessecação atuando de forma que ocorra uma substituição da água de hidratação e através da formação de biovidro, ou vitrificação (Clegg, 2001). Este biovidro, aparentemente, aprisiona as macromoléculas em um meio estável e amorfo, prevenindo assim a deterioração da célula (Iturriaga, 2008).

O processo de anidrobiose consiste em 3 fases: desidratação, dessecação e seco. No primeiro, ocorre a perda progressiva de água, com todas as estruturas celulares permanecendo totalmente hidratadas. Concomitantemente, ocorre alterações no pH e na viscosidade do citosol, devido a mudanças na concentração intracelular. Estas alterações

podem prejudicar as interações de hidrogênio, forças de Van der Waals e forças hidrofóbicas, levando à desestabilização de ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos de membrana dentre outros compostos (Stryer, 1999 *apud* Tunnacliffe A e Lapinski J, 2003). Neste momento as vias bioquímicas começam a falhar e é neste período em que as respostas necessárias para a sobrevivência do organismo se inicia. Proteínas hidrofílicas e dissacarídeos não-redutores são importantes neste momento (Wright, 2001).

No segundo estágio, a célula atinge valores de água de 0,3g/g de massa seca até valores de 0,1g/g de massa seca. É neste momento em que ocorre o cessamento do metabolismo. A água se torna tão escassa que as moléculas intracelulares não estão completamente hidratadas, e isto leva a uma instabilidade estrutural. De acordo com algumas hipóteses, neste estágio os dissacarídeos acumulados na fase de desidratação atuam substituindo as moléculas de água (com a formação de pontes de hidrogênio). Isto não permite que danos estruturais irreversíveis sejam causados nas membranas e macromoléculas (Tunnacliffe e Lapinski, 2003).

No terceiro e último estágio (seco), a anidrobiose é realmente representada e pode perdurar por longos períodos. É nesta fase em que se observa a troca do citoplasma pelo biovidro. Em teoria, esta matriz sólida impede a difusão molecular levando a um estacionamento das reações químicas, ou seja, ela promove a animação suspensa (Crowe, 1998).

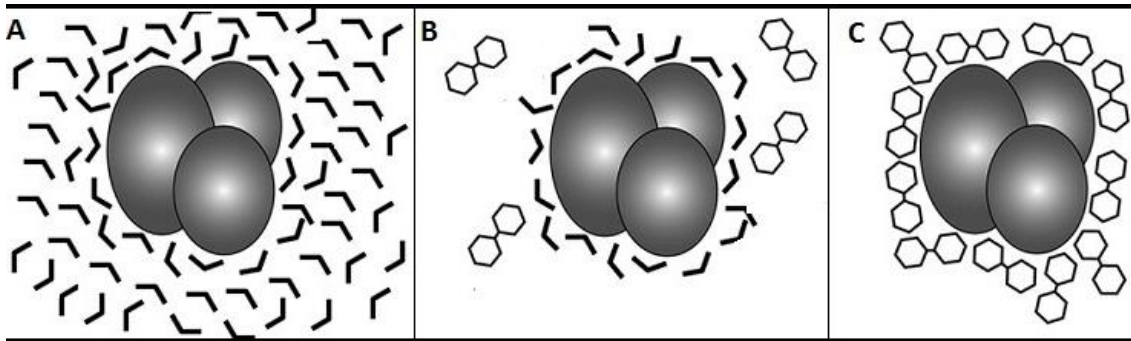


Figura 1. Manutenção da estrutura de macromoléculas na anidrobiose. Em (A) temos a hidratação total, onde a estrutura da proteína está conservada. Em (B) a desidratação contínua leva à síntese de trealose (hexágonos) que não está em contato com a proteína neste momento. Quando ocorre a dessecação total (C) temos a formação de uma concha de biovidro que estabiliza a conformação proteica (Adaptado de Chiu, 2011).

No entanto, a simples presença de dissacarídeos não-redutores é insuficiente para anidrobiose (Higa e Womersley, 1993). Em 2000, um experimento realizado com células de mamíferos (sabidamente não anidrobióticos), a síntese de trealose não conferiu resistência frente a dessecação (Garcia de Castro e Tunnacliffe, 2000). Além disso, em rotíferos bdeloides não foi registrado qualquer acúmulo de trealose ou molécula análoga durante o processo de anidrobiose (Lapinski e Tunnacliffe, 2003).

Com isso, podemos constatar que trata-se de um fenômeno altamente complexo, e que há, possivelmente, vias alternativas para a indução do processo de anidrobiose. Esta indução envolve uma gama de mecanismos que estão relacionados com a manutenção da integridade celular no estado seco.

Outras adaptações possivelmente envolvidas são: modificações na membrana celular; biossíntese e acúmulo de proteínas hidrofílicas (como as proteínas LEA); acúmulo de solutos anfifílicos; ativação de sistemas antioxidantes, de reparo e proteção (Reardon *et al.*, 2010).

O conhecimento e elucidação dos mecanismos de tolerância a dessecação é de total importância para uma nova área de estudo: a engenharia anidrobiótica. Neste contexto, a validação de genes candidatos a participantes desta via se faz necessária e fundamental. A engenharia anidrobiótica visa a transformação de células/estruturas

biológicas tolerantes ao estresse hídrico (Garcia de Castro *et al.*, 2000). A viabilidade preservada dessas estruturas na ausência de água traria um enorme avanço na medicina moderna, no que se refere a: transplantes de órgãos, transporte de vacinas, manutenção de bancos de células e tecidos dentre outras aplicações.

1.2 TIPOS DE ESTRESSE E RESISTÊNCIA

Em resposta à diminuição da umidade relativa no ambiente, é desencadeada uma série de respostas fisiológicas (ainda desconhecidas) que acabam por promover mudanças morfológicas nos indivíduos. A mudança mais característica é a retração das extremidades do corpo (Baumann, 1922 *apud* Welnicz, 2011). Quando presentes neste estado de organização biológica, eles se tornam resistentes a uma ampla variedade de condições ambientais extremas. A capacidade de entrar no estado de anidrobiose permite que esses organismos ocupem ambientes extremos bem como colonizem e se dispersem em novos habitats (Nelson, 2002; Bertolani *et al.*, 2004).

Vários estudos têm sido conduzidos, sobretudo utilizando tardígrados, no intuito de testar quais são os limites tolerados por esses organismos, quando no estado de anidrobiose, para o que consideramos “extremos” para a nossa espécie. Pesquisas sobre resistência de espécimes dessecados indicam que estes organismos podem sobreviver à exposição a temperaturas acima de 150°C e próximas do zero absoluto (Gilbert, 1974), como demonstrado para rotíferos *P. roseola*. Adicionalmente, outros estudos, realizados com tardígrados, testaram a resistência frente a altas doses de radiação UV, evidenciando que, durante o estado de animação suspensa, estes organismos são altamente tolerantes a tal radiação (Tanguay *et al.*, 2004; Altiero *et al.*, 2011; Persson *et*

al., 2011;), além de radiação ionizante (Beltrán-Pardo *et al.*, 2013) e inclusive sobrevivem ao vácuo (Jönsson, 2008).

1.3 INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi)

Em 1997, Craig Mello e colaboradores se referiram a um mecanismo de silenciamento gênico induzido por RNA até então desconhecido e não-elucidado. Este mecanismo, de acordo com os autores, parecia “ser distinto do RNA antisenso convencional, pois ambas fitas de RNA, senso e antisenso, causaram efeitos similares” quando do silenciamento gênico em *C. elegans* (Rocheleau *et al.*, 1997). Como este mecanismo ainda era desconhecido, eles se referiram à tal técnica denominando-a de RNAi, como sinônimo de interferência mediada por RNA (Rocheleau *et al.*, 1997).

Em 1998, o uso foi divulgado e o termo “Interferência por RNA” (RNAi) foi então dispersado pela comunidade científica. Inicialmente, a técnica RNAi foi aplicada ao processo no qual moléculas de RNA dupla fita (dsRNAs) eram injetadas no nematoide *C. elegans* e levava a um silenciamento específico de RNAs mensageiros, o que permitia identificar a função gênica (Fire *et al.*, 1998).

O mecanismo de RNAi ocorre de forma natural em células da maioria de eucariotos, e podem estar envolvidas na eliminação de RNAs mensageiros anômalos e na proteção do genoma contra transposons e patógenos virais (Baulcombe, 1999; Tabara *et al.*, 1999).

O silenciamento ocorre da seguinte forma: uma enzima denominada Dicer (uma endoribonuclease do tipo III) cliva as moléculas de dsRNAs introduzidas em fragmentos menores de RNA dupla fita, com cerca de 21-25 nucleotídeos, denominados

de siRNAs (*small interfering RNAs*), que possuem 2-3 nucleotídeos *overhang* (não pareados) na extremidade 3' OH. Este duplex formado é então levado a um complexo multiproteico chamado de RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), onde ocorre o reconhecimento das fitas *sense* e *antisense* levando à degradação da primeira e ao carregamento da segunda. Quando é encontrado no transcriptoma um RNA perfeitamente complementar, o complexo RISC (através de uma enzima associada, denominada SLICER) realiza a clivagem do mensageiro, levando assim, a um silenciamento pós-transcricional (Hamilton e Baulcombe, 1999; Bernstein *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2004; Novina e Sharp, 2004; Song *et al.*, 2004).

Existem vários métodos de introdução de moléculas de dsRNAs, e cada um depende da susceptibilidade do organismo modelo em questão. Dentre os métodos, destacam-se os vetores virais (Raoul *et al.*, 2005); via imersão (*soaking*) (Maeda *et al.*, 2001); microinjeção (Fire *et al.*, 1998); via alimentação (*feeding*) (Timmons e Fire, 1998). O método de *feeding* tem uma grande importância devido à simplicidade e praticidade. Ele foi primariamente descrito em *C. elegans*, que se alimentavam de bactérias modificadas geneticamente para expressar dsRNAs que promoviam o silenciamento de genes endógenos do nematoide

Devido à simplicidade, praticidade e eficiência da técnica de RNAi, esta ferramenta tem sido extremamente útil na identificação e caracterização de genes envolvidos no processo de anidrobiose, em especial no organismo modelo deste trabalho.

1.4 MODELO DE ESTUDO

Os organismos anidrobióticos estão distribuídos em uma grande variedade de táxons e, com isso, podemos selecionar aquelas espécies que apresente as características que sejam mais convenientes para cultura/manuseio em laboratório.

Entre as plantas, podemos citar a conhecida “planta da ressurreição” *Selaginella Lepidophylla*. É uma planta de deserto reconhecida por sua habilidade de sobreviver a dessecação extrema e voltar após reidratação com pouca água em um curto período de tempo. Durante o período de seca, no seu habitat natural, o caule se enrola fazendo com que a planta adquira uma forma esférica e, após reidratação, volta à sua forma normal readquirindo, inclusive, sua cor verde dentro de três horas (Lebkuecher e Eickmeier, 1993). Ainda entre as plantas, deve-se ressaltar que as sementes de várias espécies possuem capacidade anidrobiótica (ainda que os estádios seguintes não possuam tal capacidade), sobrevivendo por longos períodos na seca e germinando apenas quando encontra disponibilidade de água e recursos adequados. Há um relato de que uma semente de tamareira (espécie *Phoenix dactylifera*) germinou após um período de, aproximadamente, dois mil anos de dormência (Sallon *et al.*, 2008).

Um outro grupo de organismos que também possuem alguns representantes com capacidade anidrobiótica é o grupo dos fungos. O representante mais significativo e amplamente estudado (não apenas no campo da anidrobiose) é a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. O fato curioso é que esta levedura é amplamente comercializada, como fermento biológico, na forma seca, e de acordo com as recomendações do fabricante, necessita apenas a adição de água ou leite para que ocorra o efeito desejado do fermento. Ou seja, necessita de reidratação para que a levedura ressuscite e possa atuar na fermentação. Vários estudos foram realizados nessa espécie, sobretudo no que diz

respeito à síntese de trealose e seus efeitos na resistência à desidratação extrema (Gadd *et al.*, 1987; Eleutheria *et al.*, 1993; Hounsa *et al.*, 1998; Sano *et al.*, 1999).

Entre os invertebrados, podemos citar como exemplo o crustáceo *Artemia franciscana*, que vive em um ambiente com alta variação na salinidade, temperatura, umidade e também na disponibilidade de oxigênio (Triantaphyllidis, 1998; Van Stappen, 1998). A fêmea grávida pode liberar larvas livre-natantes ou então embriões encistados, com capacidade anidrobiótica, encerrados em um complexo impermeável, onde os embriões permanecem com o metabolismo cessado (MacRae, 2003; Anderson *et al.*, 1970; Denlinger, 2002;). Ainda entre os invertebrados, temos o grupo dos rotíferos, que também possui representantes com capacidade anidrobiótica, como a espécie *Philodina roseola*, cuja capacidade anidrobiótica foi reportada pela primeira vez por Antony van Leeuwenhoek, e desde então também vem sendo alvo de amplas pesquisas.

Dentre os organismos modelo no campo da anidrobiose destacam-se os tardígrados, também conhecidos como “ursos d’água”. São invertebrados microscópicos com um tamanho variando entre 0,05-1,2µm (Nelson, 2002) e com distribuição cosmopolita, podendo ser encontrado em uma grande variedade de habitats (Degma *et al.*, 2010). O primeiro relato da capacidade anidrobiótica dos tardígrados foi feita por Johan Goeze, em 1773 (Goeze, 1773 *apud* Welnicz, 2011), e desde então as espécies de tardígrado tem sido amplamente estudadas, com especial atenção para as espécies: *Milnesium tardigradum*, *Paramacrobiotus richtersi*, *Richtersius coronifer* e *Ramazzotius oberhaeuseri* (Welnicz, 2011).

No presente estudo, utilizamos o nematoide *Panagrolaimus superbus* como organismo modelo, cujo gênero possui ampla distribuição, indo da Antártica até solos de clima temperado. São vermes de vida-livre, dioicos, e se alimentam de bactérias, o

que facilita sua manutenção em laboratório bem como permite uma ampla utilização de ferramentas desenvolvidas para o organismo modelo *Caenorhabditis elegans* (Brenner, 1974; Shannon *et al.*, 2005). Membros do gênero *Panagrolaimus* possuem representantes anidrobióticos estrategistas rápidos e lentos. Os estrategistas lentos são aqueles que necessitam de um período de pré-aclimatação para a entrada no processo de anidrobiose. Os estrategistas rápidos são aqueles que não necessitam desse período de pré-adaptação e, portanto, podem entrar rapidamente no processo de anidrobiose (Shannon *et al.*, 2005).

A escolha do nematoide *Panagrolaimus superbus* como animal modelo do presente estudo se justifica já que este é um animal que permite a utilização das mesmas formas de cultura empregadas para o verme modelo *Caenorhabditis elegans*. Além disso, foi demonstrado que o verme *P. superbus* é susceptível à técnica de Interferência por RNA (RNAi) pelo método de *feeding* (ingestão) (Shannon, 2008). Este fato possibilita a utilização da RNAi em *P. superbus* para a identificação de genes possivelmente relacionados à anidrobiose, como por exemplo os genes LEA, tema do presente estudo.

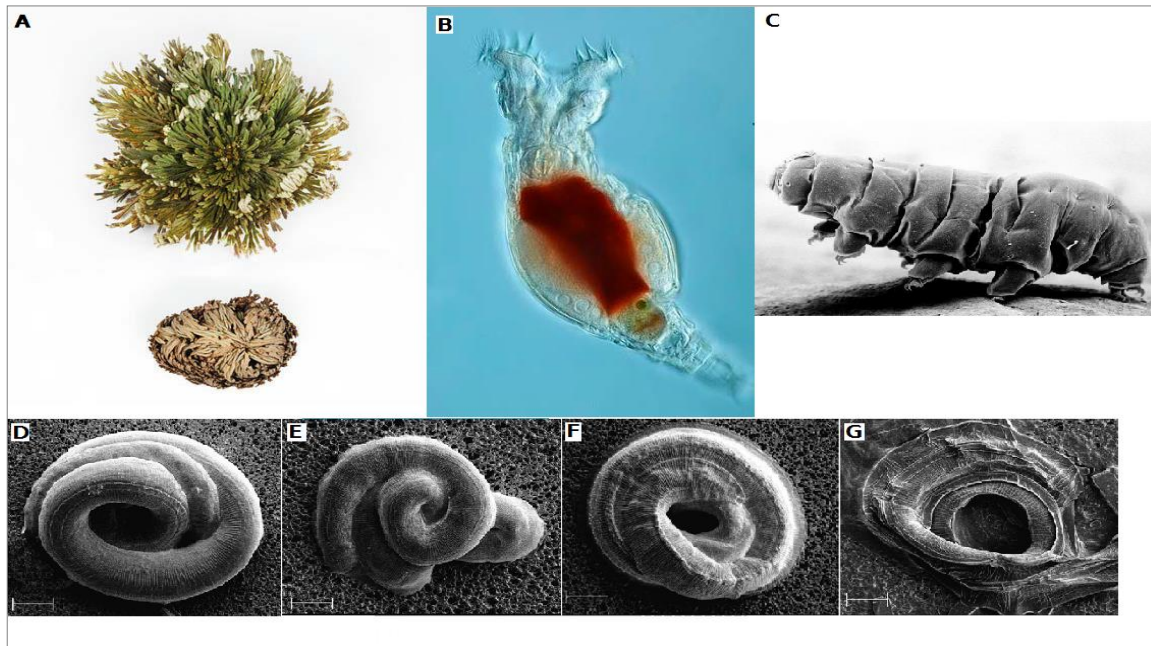


Figura 2. Exemplos de organismos anidrobióticos. Em (A) temos a planta da ressurreição (*Selaginella lepidophylla*); em (B) o rotífero *Philodina rotifer*; em (C) um tardígrado, animal modelo em vários estudos de anidrobiose; em D temos o modelo do presente estudo *Panagrolaimus superbus*, de E – G temos outras espécies do gênero *Panagrolaimus* que não são anidrobióticas e foram submetidas ao teste de dessecação em sílica gel (umidade relativa de 10%). Imagens fora de escala. Imagens A – C retiradas da Science Photo Library. Imagens D – G retiradas de Shannon *et al.*, 2005.

1.5 PROTEÍNAS LEA (*Late Embryogenesis Abundant*)

Uma das características dos organismos anidrobióticos é a síntese de altas concentrações de açúcares não-redutores durante a indução do processo de anidrobiose, como trealose e sacarose em animais e plantas, respectivamente (Crowe, 1992). Esses açúcares tem o papel de proteger membranas e proteínas do dano causado pela dessecação extrema. Essa proteção é feita através da formação de um *bioglass*, que se dá pela substituição das moléculas de água por tais açúcares, que leva à estabilização do conteúdo celular (Clegg, 2001) permitindo a sua proteção (Iturriaga, 2008). Porém, apenas o acúmulo desses açúcares não é suficiente para a anidrobiose (Higa e Womersley, 1993).

Uma classe de proteínas conhecida como LEA (Late Embryogenesis Abundant) é acumulada em resposta ao déficit de água em muitas plantas, cianobactérias e também em alguns invertebrados, como nematoides (Browne, 2002; Tunnacliffe e Wise, 2007), e desempenha um papel importante na tolerância à dessecação extrema (Iturriaga, 2008). São proteínas altamente hidrofílicas e termoestáveis, tendo em sua composição uma alta presença dos aminoácidos glicina, glutamina e alanina (Iturriaga, 2008).

Sua importância para o processo de anidrobiose se deve à sua plasticidade funcional, tendo possíveis atuações como: antioxidante; se ligando a íons; associando-se e estabilizando membranas; proteção enzimática; e escudo molecular (Tunnacliffe e Wise, 2007).

Foi proposto que as proteínas LEA, pelo menos em alguns casos, exercem função de antiagregação durante a desidratação prevenindo interações entre proteínas parcialmente enoveladas que de outra forma iriam gerar agregados intracelulares.

Uma característica importante das proteínas LEA é a de que sua conformação ativa só é encontrada durante o processo de anidrobiose. Ou seja, em condições normais de umidade, uma proteína LEA se encontra na forma inativa, adquirindo funcionalidade apenas durante a desidratação e dessecação (Hand *et al.*, 2011) . Porém, quando liofilizada, ela mantém sua conformação inativa, isto pode ser devido ao rápido congelamento que precede a desidratação e pode evitar a formação das estruturas de alfa hélice (Tollete *et al.*, 2007).

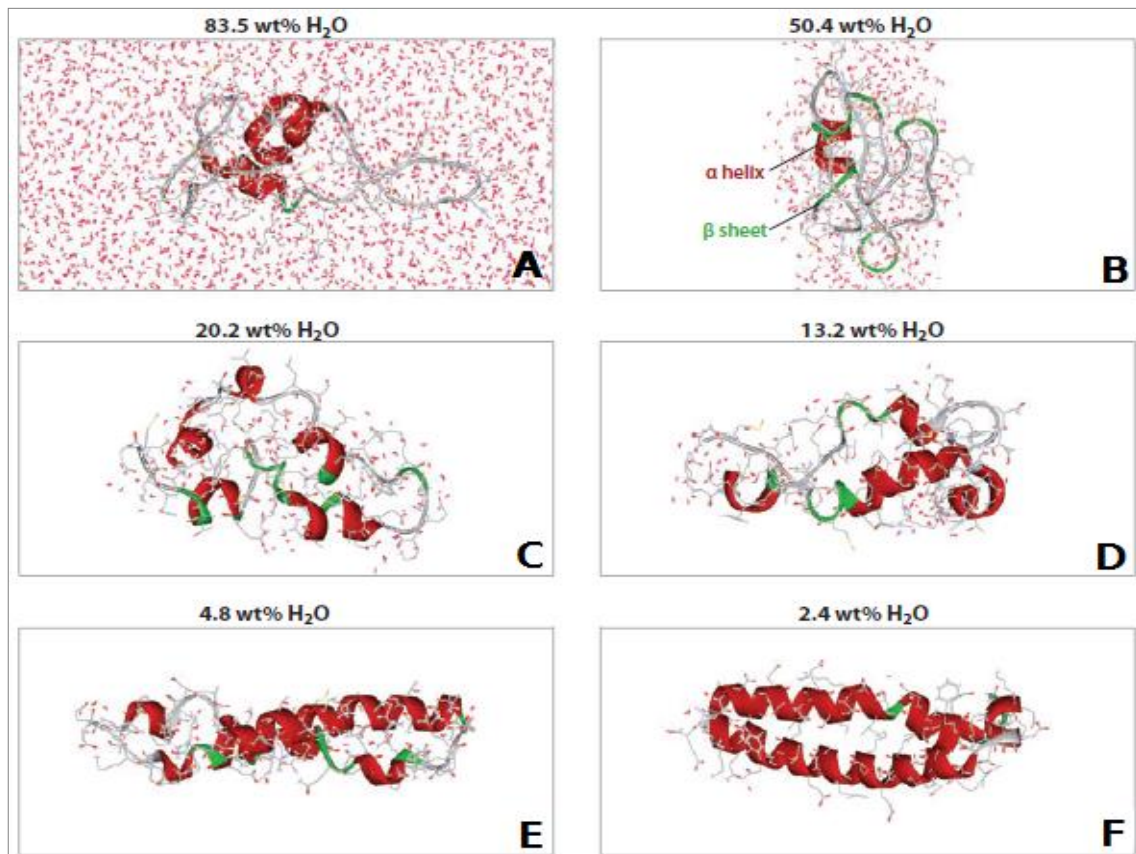


Figura 3. Conformação da proteína LEA em diferentes umidades relativas. Frente à diminuição do conteúdo de água na célula (A - F) notamos que LEA vai adquirindo sua estrutura secundária conforme diminui-se a disponibilidade de água. Sua forma ativa encontra-se apenas em quantidades mínimas de água, o que corrobora os dados de Hand (2011) e Chakrabortee (2012). Modificado de Hand *et al.*, 2011.

Sua função ainda permanece por ser esclarecida, porém resultados recentes indicam que elas atuam como “escudos moleculares”, se associando livremente com a superfície de uma proteína alvo, formando uma barreira de proteção ao seu redor (Chakrabortee *et al.*, 2012).

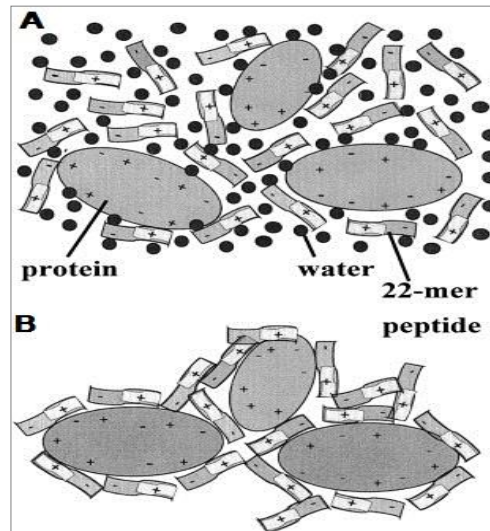


Figura 4. Formação do “Escudo molecular”. Em (A) nota-se a grande disponibilidade de água (círculos pretos) e a disposição das proteínas intracelularmente, bem como dos peptídeos derivados de uma LEA (fitas com polaridade positiva e negativa). Quando ocorre a dessecação e a disponibilidade de água fica próximo de zero (B), as proteínas LEA adquirem sua conformação ativa e então se associam à superfície das proteínas, formando uma espécie de “escudo molecular”, substituindo as moléculas de água (Adaptado de Furuki *et al.*, 2012).

1.6 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

O conhecimento dos mecanismos de tolerância a dessecação é de total importância para uma nova área de estudo: a engenharia anidrobiótica, e este é um tópico de grande interesse médico e comercial.

Na agricultura, o desenvolvimento de linhagens resistentes a seca traria enormes avanços na produção de alimentos em áreas impróprias para determinado cultivo. Da mesma forma, o controle de espécies anidrobióticas parasitas de plantas, poderia ser realizado com mais precisão como, por exemplo, através da fabricação de novos nematicidas para o controle de nematodas parasitas de plantas e que são resistentes aos nematicidas convencionais. No caso da produção de sementes e plantas transgênicas resistentes a seca, uma possível forma de confecção seria a introdução de cópias e/ou

indução da expressão de genes participativos da via de anidrobiose, o que permitiria a sobrevivência dessas espécies em condições ambientais naturais de estresse hídrico (França *et al.*, 2002). Em 2008, Suárez e colaboradores, realizou um experimento no qual houve o aumento na expressão do gene Trealose-6-fosfato sintase na bactéria simbiótica *Rhizobium etli*, e estas foram, então, inoculadas na planta *Phaseolus vulgaris*. O que se observou foi o aumento na tolerância à dessecação e, também, aumento na produtividade desta planta. De acordo com os autores, o metabolismo da trealose em *Rhizobium* é fundamental para a sinalização de crescimento, produção e adaptação a estresses abióticos, e sua manipulação tem grande impacto agrônômico em plantas leguminosas (Suárez, 2008)

No campo da medicina, a conservação de órgãos e tecidos possui enorme importância. Sabe-se da dificuldade existente em manter um órgão em condições adequadas até que se encontre o receptor apropriado, uma vez que demanda armazenamento em baixas temperaturas por um longo período de tempo. A capacidade de manter um órgão a seco seria, portanto, não apenas uma opção mais vantajosa, já que poderia ser armazenado por um período maior do que atualmente conseguimos, mas também seria uma alternativa mais barata que a atual, já que não necessita de manutenção em baixas temperaturas como as atualmente utilizadas. A necessidade da estabilização de células na forma seca é urgente na preservação de órgãos e tecidos para transporte e aplicações médicas, e também no armazenamento a longo prazo.

Estudos com o dissacarídeo trealose têm mostrado alguns resultados significativos na conversão de células de mamíferos resistentes ao congelamento (Eroglu *et al.*, 2002; Wolkers *et al.*, 2002), e também na conversão de células humanas resistentes à dessecação (Guo *et al.*, 2000). A aplicabilidade dessas técnicas levou ao surgimento, em 2010, de uma técnica de termoestabilização de vacinas de vetores virais

vivos, utilizando-se das propriedades conferidas pelos dissacarídeos não-redutores trealose e sacarose. Nesta técnica, as vacinas são suspensas em uma solução de trealose-sacarose e são depositadas em uma membrana, que após a secagem, formam um vidro ultrafino (devido a capacidade de vitrificação destes açúcares) que acaba por imobilizar os vetores virais e os mantêm estáveis por até 6 meses. Estas membranas podem ser transportadas através de um adaptador, que, no momento da utilização, é colocado entre a seringa e a agulha. Durante a aplicação da vacina, a solução tampão presente na seringa dissolve o biovidro e, concomitantemente, ocorre a ativação da vacina, que flui para a agulha permitindo a entrada no organismo (Alcock *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICATIVAS

O estudo do processo da anidrobiose é essencial para o avanço de uma recente área de pesquisa, a engenharia anidrobiótica, cuja finalidade é tornar materiais biológicos tolerantes à dessecação assim como acontece com os anidrobiotos (de Castro *et al.*, 2000; Tunnacliffe *et al.*, 2001; Manzanera *et al.*, 2002). A possibilidade de preservação de materiais em uma forma seca traria grandes avanços na medicina pois permitiria: manter órgãos para transplante por um longo período de tempo (bem como transportá-los por longas distâncias), manutenção de bancos de células e tecidos a um custo bem menor (uma vez que não seria necessário o uso de equipamentos para manutenção em baixas temperaturas).

Adicionalmente, com a compreensão dos mecanismos da anidrobiose, outras aplicações podem emergir como, por exemplo: o desenvolvimento de técnicas que tornem materiais resistentes à radiação (Watanabe *et al.*, 2006a; Watanabe *et al.*, 2006b); mecanismos de animação suspensa para viagens longas, como por exemplo entre planetas (Horikawa *et al.*, 2008; Guidetti *et al.*, 2012); e também uma possível extensão da longevidade (Honda *et al.*, 2010).

É sabido que apenas o acúmulo de dissacarídeo não-redutores, como a trealose e a sacarose, não é suficiente para a anidrobiose (Tunnacliffe e Lapinsky, 2005). Neste contexto, as proteínas LEA têm um papel fundamental para o processo, uma vez que possuem uma ampla plasticidade funcional, como já descrito anteriormente. Além disso, é sabido que as proteínas LEA estão envolvidas com a capacidade de resistência à dessecação em plantas (Ingram e Bartels, 1996; Oliver *et al.*, 2000; Hoekstra, 2001) e em outros invertebrados (Browne *et al.*, 2004; Kikawada *et al.*, 2006; Schokraie *et al.*, 2010;). No entanto, ainda não há estudos no nematoide *P. superbus*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O presente estudo visou analisar a participação diferencial de três proteínas LEA na via de resistência à dessecação extrema do nematódeo *P. superbus* e caracterizar os efeitos do *knockdown* de LEA-12 na morfologia, desenvolvimento e comportamento desta espécie.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Silenciar, individualmente, três genes codificadores de proteínas LEA (LEA-1, LEA-4 e LEA-12) via RNAi por alimentação.
- Confirmar o silenciamento através da análise de expressão por RT-PCR.
- Avaliar se estes três genes são essenciais. Para isso, determinaremos a taxa de sobrevivência de vermes silenciados (análise pré-dessecação).
- Revalidar o envolvimento destes três genes na anidrobiose de *P. superbus*. Para isto, silenciaremos estes três genes via RNAi e determinaremos a porcentagem de sobrevivência após dessecação e reidratação (teste pós-dessecação).
- Determinar se o silenciamento do gene LEA-12 promove alterações fenotípicas, abrangendo características morfológicas, de desenvolvimento e comportamentais, sob condições normais de umidade relativa.

4. MATERIAIS

E

MÉTODOS

4.1 PLACAS DE MANUTENÇÃO

Os animais utilizados na realização dos experimentos (*P. superbus*) foram obtidos devido à colaboração estabelecida com o laboratório do Prof. Dr. Alan Tunnacliffe (Universidade de Cambridge, Reino Unido), que gentilmente nos forneceu amostras destes nematoides. A partir de então, culturas de *P. superbus* foram mantidas em laboratório a 21°C, no escuro, em placas de meio ágar NGM (*Nematode Growth Medium*) contendo bactérias *Escherichia coli* (linhagem OP50) para alimentação.

4.2 CLONES DE LEAs SELECIONADAS

As sequências selecionadas são três cDNAs parciais clonados no vetor L4440, que se encontra inserido na bactéria da linhagem HT115 DE3 RNase III⁻. Os clones foram gentilmente fornecidos pela Dra. Ann Burnell (Universidade Nacional da Irlanda, Irlanda) devido à colaboração estabelecida com nosso laboratório. O vetor possui um marcador de resistência à ampicilina e dois promotores T7 em orientações opostas, flanqueando o inserto, cuja transcrição ocorre mediante indução por IPTG. A transcrição do inserto neste caso é bidirecional e, assim, ocorre a formação de moléculas de RNA de dupla fita (dsRNA) referentes ao gene-alvo. Devido à ausência de RNase do tipo III, essas moléculas não são degradadas nessa linhagem bacteriana e permanecem na forma de dsRNA até que ocorra a ingestão destas bactérias pelos vermes.

4.3 PREPARAÇÃO DAS PLACAS DE INDUÇÃO

Bactérias da linhagem HT115, transformadas com o vetor L4440 (contendo a sequência de LEA-1, -4 ou -12), foram cultivadas em tubos de 50 mL em LB ampicilina (50 µg/mL) sob agitação (210 rpm) *overnight* a 37°C. Posteriormente, os tubos foram

centrifugados durante 10 minutos a 4°C e 3500 g. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos em 600 µL de meio LB e depositados em placas de *Petri* contendo meio NGM ágar e IPTG (1 mM). A permanência nestas condições deu-se por um período de 2 dias a temperatura ambiente, com a finalidade de induzir a produção de dsRNAs pelas bactérias. Bactérias HT115 transformadas com L4440::GFP foram utilizadas como controle negativo.

4.4 SILENCIAMENTO GÊNICO VIA RNAi POR ALIMENTAÇÃO

Os vermes das placas de manutenção foram coletados adicionando-se 5 mL de tampão M9 e posteriormente transferidos para um tubo de ensaio de 50 mL contendo 45 mL de M9, sendo mantidos em repouso por 10 minutos para precipitação. Em seguida, retirou-se o sobrenadante, restando apenas o *pellet* (vermes) no fundo do tubo de ensaio. Este procedimento de lavagem foi realizado quatro vezes para redução da quantidade de bactérias OP50. Os vermes foram então transferidos para as placas de *Petri* contendo as bactérias HT115 já induzidas, visando o silenciamento gene-específico.

4.5 DIVISÃO DAS AMOSTRAS

Para garantir o silenciamento de toda população de vermes presente em cada placa, o processo de RNAi via alimentação estendeu-se por 17 dias, período após o qual os nematoides foram coletados, por meio da lavagem da placa com 5 mL de tampão M9 e transferidos para tubos de ensaio de 50 mL. Esta solução (tampão M9 + vermes) foi então proporcionalmente dividida em quatro amostras (para cada tratamento): a amostra “A” foi utilizada para a confirmação do silenciamento gênico através de RT-PCR, a amostra “B” foi empregada em testes de viabilidade pós-silenciamento (ou pré-

dessecação), a amostra “C” foi utilizada nos testes de resistência a dessecação, enquanto que a amostra “D” foi destinada as análises fenotípicas, sendo posteriormente subdividida em amostras D1, D2 e D3, para as análises morfológicas, comportamentais e de desenvolvimento, respectivamente.

4.6 CONFIRMAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO VIA RT-PCR

As sequências nucleotídicas dos primers utilizados na realização da RT-PCR são apresentados a seguir.

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados na reação de RT-PCR. Os *primers* foram desenhados utilizando-se o programa Gene Runner.

Ps-LEA-1	Ps-LEA1-F GGGAGCACAAGTTAAACCAGT
	Ps-LEA1-R1 AGTTTCTTTTATTTCCACCAGC
	Ps-LEA1-R2 GGCAGCATTTTCGCGAGTTTT
Ps-LEA-4	Ps-LEA-4 F GAAGATGTCAGTGATTATGTA
	Ps-LEA-4 R1 ATCGACAACATATTCTCCAGC
	Ps-LEA-4 R2 CTTCACCAGCTTTGTAAATAA
	Ps-LEA-4 R3 CCTTTACATCACCTTCATCTG
Ps-LEA-12	Ps-LEA12-F1 TCAATGATGCCAGTGACTCTG
	Ps-LEA12-R1 GCGGCATTCTGAGTTGTATTC

4.7 TESTE DE VIABILIDADE PÓS-SILENCIAMENTO

Visando determinar se o silenciamento de alguma das LEAs *per se* é letal para os vermes, realizaram-se testes de viabilidade pós-silenciamento. Esta análise foi feita

para quatro grupos (em triplicata): vermes tratados com dsRNA contra GFP (controle negativo), dsRNA contra LEA-1, dsRNA contra LEA-4 e dsRNA contra LEA-12, retirados das respectivas amostras B. Neste procedimento, a determinação da porcentagem de sobrevivência deu-se via coloração com Erythrosin B. Para isto, adicionou-se 1 mL do corante (Erythrosin B 0,4% w/v em tampão M9; Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) em cada uma das amostras, pelo período de quatro horas, após o qual realizou-se a lavagem das mesmas com tampão M9. Com a morte dos nematoides, ocorrem alterações nas propriedades da membrana plasmática de suas células, que têm como resultado a perda da sua permeabilidade seletiva, permitindo a entrada do corante nas células mortas (Evangelista, 2011). Deste modo, os vermes mortos adquirem uma coloração avermelhada quando observados ao microscópio óptico, facilitando a identificação e distinção entre os vermes vivos e mortos. A partir disso, obtém-se a porcentagem de viabilidade para cada tratamento, dividindo-se o número de vermes vivos pelo número total de indivíduos.

4.8 TESTE DE VIABILIDADE PÓS-DESSECAÇÃO

Os testes envolvendo a dessecação extrema dos vermes foram realizados para quatro grupos (em triplicata): vermes submetidos ao tratamento com dsRNA contra GFP (controle negativo), dsRNA contra LEA-1, dsRNA contra LEA-4 e dsRNA contra LEA-12, retirados das respectivas amostras C. Aproximadamente 250 vermes de cada grupo foram imobilizados em membranas de filtro Supor 0,45 μ m (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) por filtração a vácuo, com o auxílio do funil de Sartório, e posteriormente foram introduzidos em tubos de ensaio de 1,5 mL. Estes, por sua vez, foram submetidos a um ambiente com umidade relativa (RH) de 98% (solução saturada de sulfato de cobre) por

24h e, após este período, as amostras foram transferidas para RH de 10% (sílica gel regenerada), permanecendo nestas condições durante 24h. Em seguida, os vermes foram pré-hidratados em RH 100% (vapor de água destilada) por 24h. Posteriormente, houve a reidratação dos mesmos pela adição de 1,5 mL de tampão M9. A determinação da viabilidade após a dessecação foi realizada via coloração, utilizando-se o corante Erythrosin B, seguindo a metodologia descrita anteriormente.

4.9 ANÁLISES FENOTÍPICAS

4.9.1 MORFOLOGIA

A caracterização morfológica foi realizada com base no conteúdo presente na amostra D1, analisando-se os seguintes parâmetros: integridade da cutícula (presença de rupturas ou outras anormalidades), dimensão, estrutura geral da vulva e da faringe. Além disso, quaisquer outras eventuais alterações morfológicas mais evidentes foram consideradas. A maioria dos parâmetros foi analisada através da observação direta via do microscópio óptico de pelo menos 150 vermes (para cada tratamento em triplicata: GFP e LEA-12), comparando-se sua morfologia entre os grupos controle e os grupos LEA-12 silenciados.

4.9.2 MENSURAÇÃO DA DIMENSÃO

Especificamente para a análise da dimensão dos vermes utilizou-se o programa ScopePhoto, considerando os seguintes estádios de desenvolvimento: ovos (comprimento e espessura), e vermes adultos (espessura determinada a partir do ponto médio do animal) (figura 3). A categorização e o diâmetro das fases larvais (L1, L2, L3 e L4) foram obtidos a partir de dados previamente padronizados por Guidelli (2011).

Este procedimento foi realizado para dois tratamentos: um grupo referente aos vermes tratados com dsRNA contra LEA-12 e para o controle negativo (dsRNA contra GFP), analisando-se ao menos 40 indivíduos de uma população mista de vermes em cada tratamento.

4.9.3 COMPORTAMENTO

As análises comportamentais procederam por meio da observação direta no microscópio óptico de 50 indivíduos (para cada tratamento) contidos na amostra D2, bem como da elaboração de vídeos de 1 minuto de duração, através do programa ScopePhoto, para posterior análise mais criteriosa. Essas observações fenotípicas atentaram para comportamentos não usuais como: dificuldade de movimentação, imobilização, contração muscular descoordenada (*twitching*), movimentação ao redor do próprio eixo (*roller*), dentre outros comportamentos incomuns, comparando-se os grupos controle e experimental (GFP e LEA-12 silenciado, respectivamente).

4.9.4 DESENVOLVIMENTO

A fim de avaliar o efeito do silenciamento da proteína LEA-12 no desenvolvimento de *P. superbis*, vermes contidos na amostra D3 foram submetidos a um procedimento de sincronização. Este procedimento consiste na utilização de uma solução de *bleaching* (0,5 M NaOH ; 1% hipoclorito de sódio) durante 15 minutos (com leve agitação a cada 3 minutos). O resultado é a desintegração dos estádios larvais e vermes adultos, restando apenas ovos viáveis. A partir disso, placas de manutenção foram colonizadas com estes ovos e novas populações sincronizadas foram formadas (a 21°C, no escuro).

A análise foi feita comparando-se os intervalos de tempo de surgimento dos estádios larvais e adulto entre o grupo controle e o grupo experimental, a fim de verificar se LEA-12 exerce algum papel relevante no desenvolvimento deste nematoide levando, por exemplo, ao estacionamento em uma das fases ou descontinuidade no ciclo de desenvolvimento do verme.

Para esta análise utilizaram-se 2 grupos (em triplicata): vermes tratados com dsRNA contra LEA-12 e dsRNA contra GFP, analisando-se ao menos 50 indivíduos em cada estágio de desenvolvimento, para cada um destes grupos. As observações foram realizadas nos períodos de tempo predeterminados (6, 24, 72 e 122 e 168 h), envolvendo a captura de imagens e vídeos através do programa ScopePhoto. O diâmetro dos vermes foi posteriormente mensurado (considerando o ponto médio do nematoide) a fim de comparar os grupos controle com o experimental (figura 5).

4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos foram realizados em triplicata, obtendo-se médias e desvios-padrão e os dados são apresentados em gráficos. Para a análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA, e como pós-teste foi utilizado *Tukey post-hoc* (para análises múltiplas) e Teste t de Student (para análises em pares). Consideram-se estatisticamente significativas diferenças cujo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE VIABILIDADE PÓS-SILENCIAMENTO

Os resultados obtidos a partir dos testes de viabilidade realizados anteriormente a dessecação são ilustrados no gráfico a seguir.

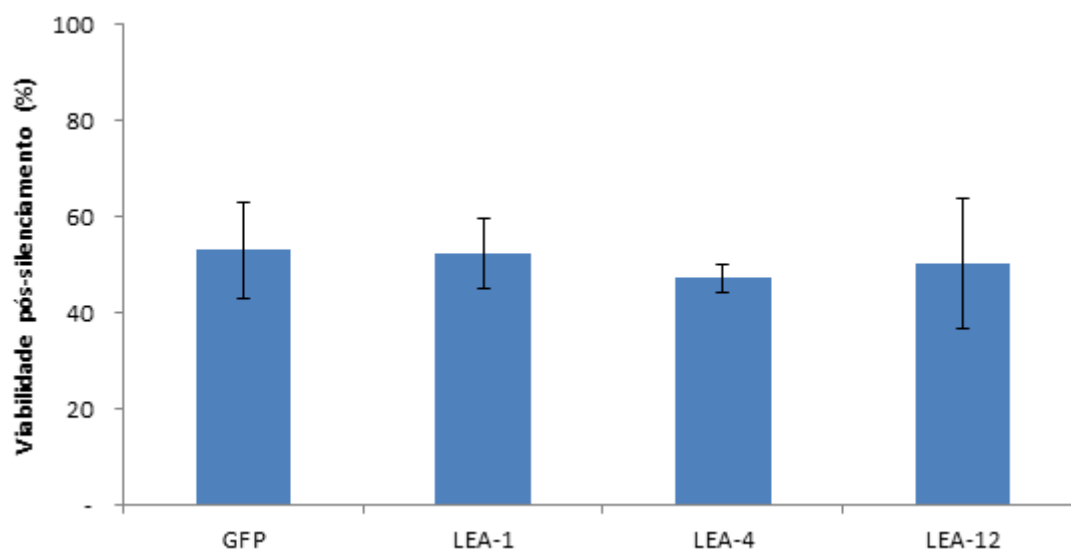


Figura 5. Taxa de viabilidade após o silenciamento (sem dessecação). Os valores das porcentagens médias de viabilidade para GFP, LEA-1, LEA-4 e LEA-12 são, respectivamente: 53,06%, 52,35%, 47,19% e 50,47%.

A análise dos resultados revela que não há diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$; *One-Way ANOVA*) na taxa de viabilidade pós-silenciamento entre o grupo controle e experimentais. Este dado evidencia que as proteínas LEA não são essenciais, em condição de umidade relativa normal, para a sobrevivência de *P. superbis* e, portanto, qualquer redução que venha a ser observada na taxa de viabilidade após o processo de dessecação deve-se a participação deste gene na via de anidrobiose.

5.2 TESTE DE VIABILIDADE PÓS-DESSECAÇÃO

Os resultados referentes ao silenciamento seguido de dessecação para cada tratamento utilizado são demonstrados abaixo.

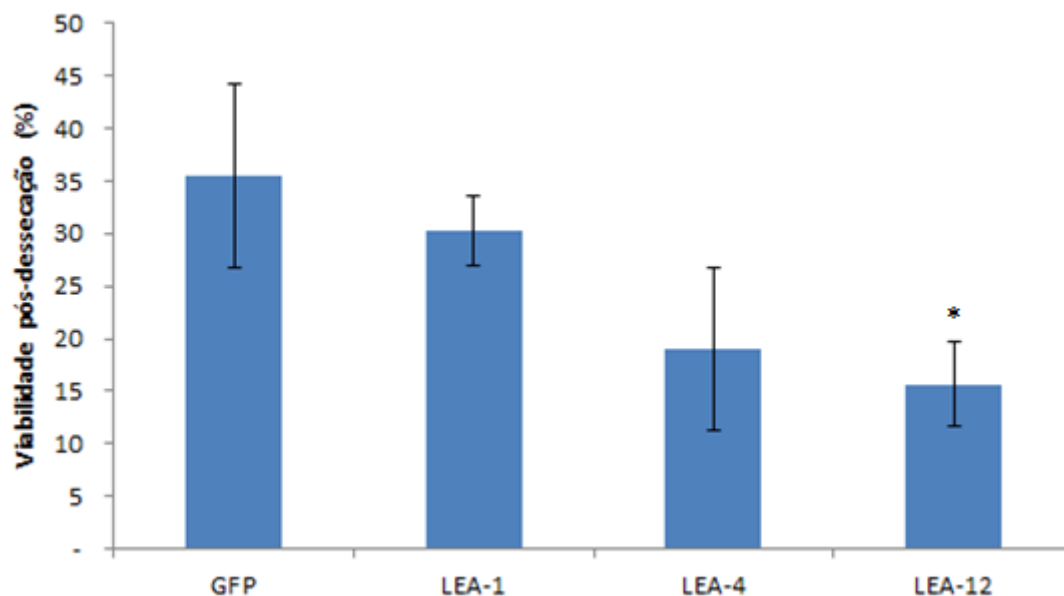


Figura 6. Porcentagens de viabilidade dos vermes silenciados e submetidos à dessecação extrema. Os valores médios das taxas de viabilidade são respectivamente: 35,22%, 30,24%, 19,01% e 15,69%.

A porcentagem de sobrevivência de LEA-12 (em média 15,69%) apresenta um valor abaixo da média do controle. Esta diferença estatisticamente significativa confirma, portanto, a hipótese de envolvimento do gene LEA-12 na via de anidrobiose do nematoide *P. superbus* ($p < 0,05$; One-Way ANOVA). Nesta análise, LEA-1 e LEA-4 também apresentaram redução em relação ao controle, porém não de forma significativa.

As análises seguintes foram realizadas apenas para o grupo LEA-12 silenciado visto que apenas o decréscimo de LEA-12 foi estatisticamente significativo, *i.e.*, apenas este grupo mostrou-se importante para o processo de anidrobiose.

5.3 ANÁLISES FENOTÍPICAS

5.3.1 MORFOLOGIA

Os resultados obtidos a partir da análise fenotípica com enfoque para as características morfológicas dos vermes silenciados para o gene LEA-12 não apontaram nenhuma alteração evidente na cutícula, estrutura da vulva e faringe, ou mesmo outras alterações morfológicas drásticas nos vermes. Todos os parâmetros listados acima foram descritos com base em uma comparação com o grupo controle (GFP), considerando-se um período de silenciamento de 17 dias.

5.3.2 MENSURAÇÃO DE OVOS E VERMES ADULTOS

Os resultados da análise dimensional dos ovos e espessura dos vermes para cada tratamento são ilustrados a seguir.

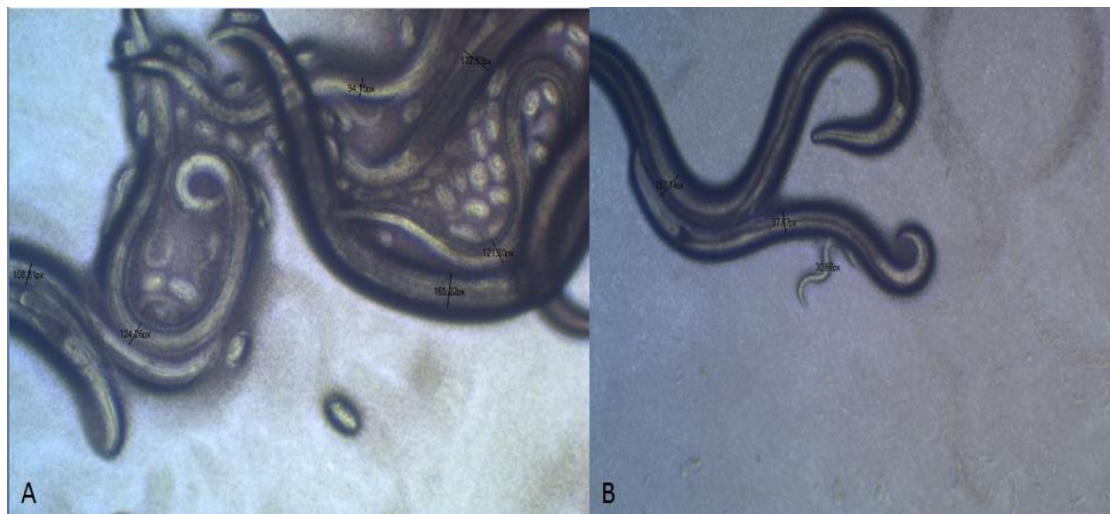


Figura 7. Imagem da morfologia dos vermes submetidos ao tratamento controle e experimental. A) Vermes submetidos ao tratamento controle (dsRNA contra GFP). **B)** Vermes submetidos ao tratamento experimental (dsRNA contra LEA-12). Aumento de 100x; 1 pixel = 0,312 µm.

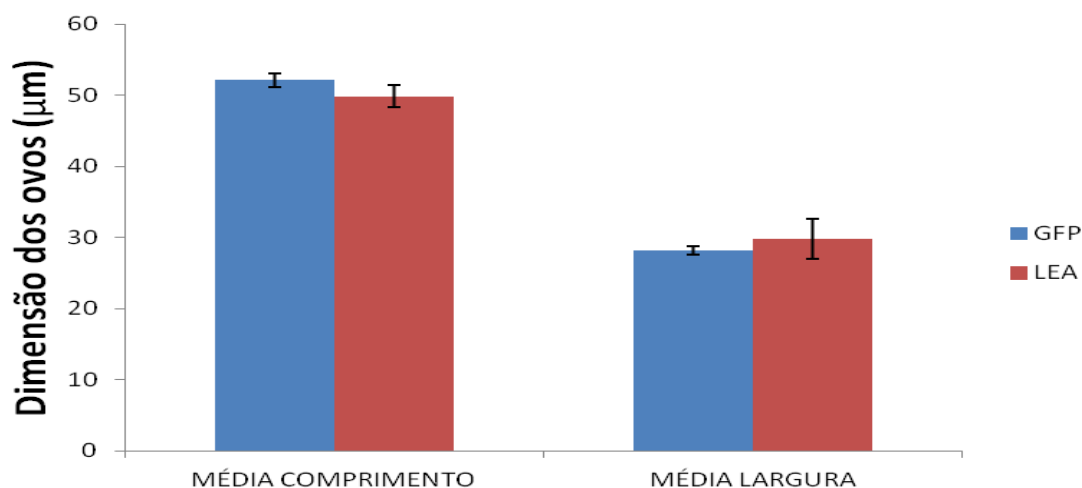


Figura 8. Relação entre o tamanho médio dos ovos e os diferentes tratamentos. Os comprimentos médios para GFP e LEA-12 são: 52,15 µm e 49,84 µm, respectivamente. A espessura (largura) média para GFP e LEA-12 são, respectivamente: 28,14 µm e 29,79 µm.

Os valores médios do comprimento e espessura (largura) dos ovos para cada tratamento não diferem estatisticamente ($p > 0,05$; teste T de Student).

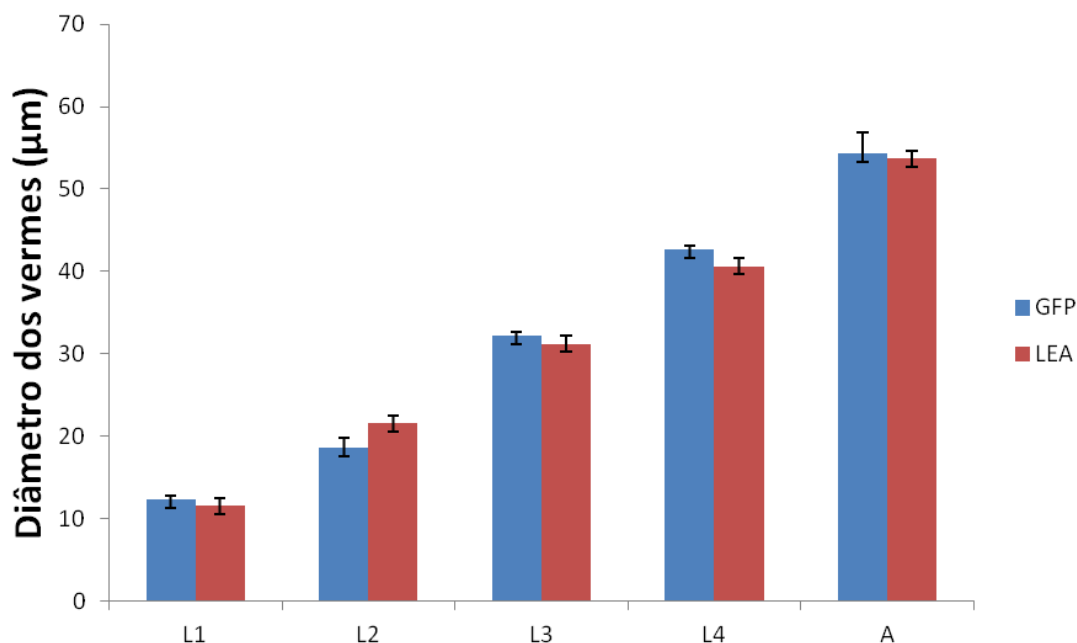


Figura 9. Valores médios do diâmetro dos vermes de uma população mista (com vermes em diferentes fases do desenvolvimento). Os valores médios (nos estádios L1, L2, L3, L4 e adulto) para os vermes submetidos ao tratamento de dsRNA contra GFP são, respectivamente: 12,32 µm, 18,55 µm, 32,15 µm, 42,64 µm e 54,35 µm. Os valores médios nos estádios L1, L2, L3, L4 e adulto, para os vermes submetidos ao tratamento experimental (dsRNA contra LEA-12) são, respectivamente: 11,56 µm, 21,55 µm, 31,21 µm, 40,63 µm e 53,68 µm.

Os testes estatísticos demonstraram que o diâmetro dos vermes não difere significativamente entre si ($p > 0,05$; teste T de Student) comparando-se os grupos controle com o LEA-12 silenciado.

A partir destes resultados pode-se inferir que o gene LEA-12 não exerce influência significativa sobre o tamanho dos ovos e diâmetro dos vermes adultos. Adicionalmente, os resultados obtidos a partir do experimento de desenvolvimento permitem concluir que o diâmetro médio das fases larvais (L1, L2, L3 e L4) não difere significativamente ($p > 0,05$; Teste T de Student), quando se compara os grupos controle e experimental para cada estágio larval. Deste modo, infere-se que LEA-12 também não afeta de forma significativa a espessura dos diferentes estádios larvais.

5.3.3 COMPORTAMENTO

As análises comportamentais não evidenciaram nenhuma alteração comportamental significativa (*roller*, *twitching*, *immobilized*) entre o grupo experimental e o grupo controle.

5.3.4 ANÁLISES DO DESENVOLVIMENTO

Os resultados obtidos a partir das análises do desenvolvimento de *P. superbis* submetidos a RNAi demonstram que, nos períodos temporais pré-definidos (Guidelli, 2011), todos os estádios de desenvolvimento são evidenciados nos vermes LEA-12 silenciados, semelhantemente ao grupo controle.

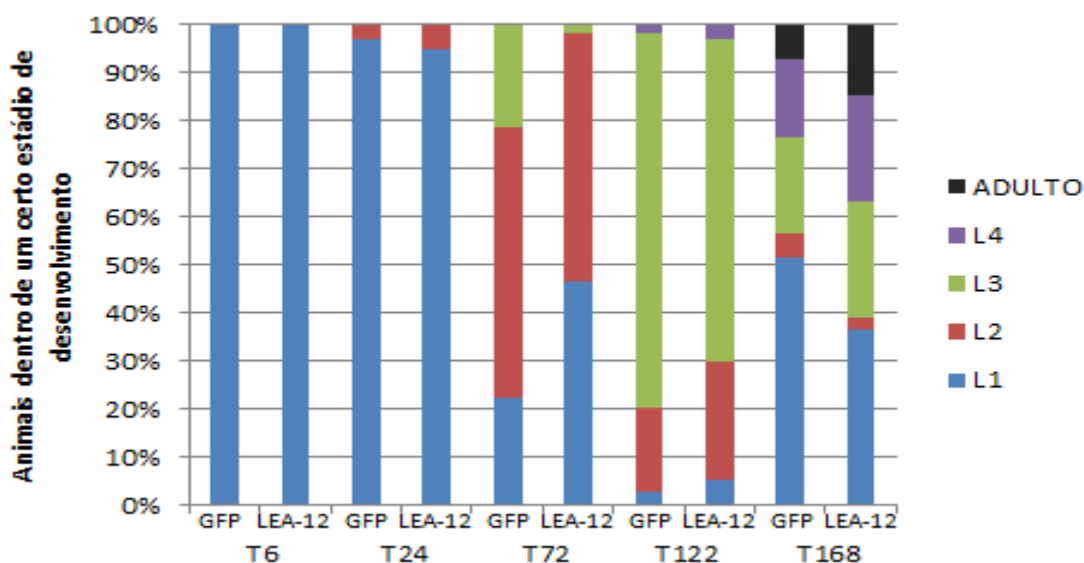


Figura 10. Porcentagem de animais em determinada fase de desenvolvimento. A análise do desenvolvimento não evidenciou diferenças como “estacionamento” ou “pulo” de alguma fase larval entre os tratamentos controle e experimental. T: tempo em horas após a eclosão.

A partir destes dados pode-se concluir que esta proteína LEA-12 não altera de maneira significativa a progressão do ciclo de desenvolvimento deste nematoide, uma vez que não se observou um estacionamento em determinada fase do desenvolvimento ou mesmo ausência de algum estágio larval. Desta forma, aparentemente, o desenvolvimento ocorre de modo normal em vermes LEA-12 silenciados, com as fases L1, L2, L3, L4 e adultos presentes nos tempos esperados.

5.4 CONFIRMAÇÃO DO SILENCIAMENTO

A confirmação molecular do silenciamento de LEA-12 não foi alcançada. Os possíveis motivos da não amplificação de LEA-12 estão descritas na seção “Discussão”. A imagem abaixo mostra que houve amplificação tanto para LEA-1 quanto para LEA-4, excluindo a possibilidade de algum problema na reação de PCR.

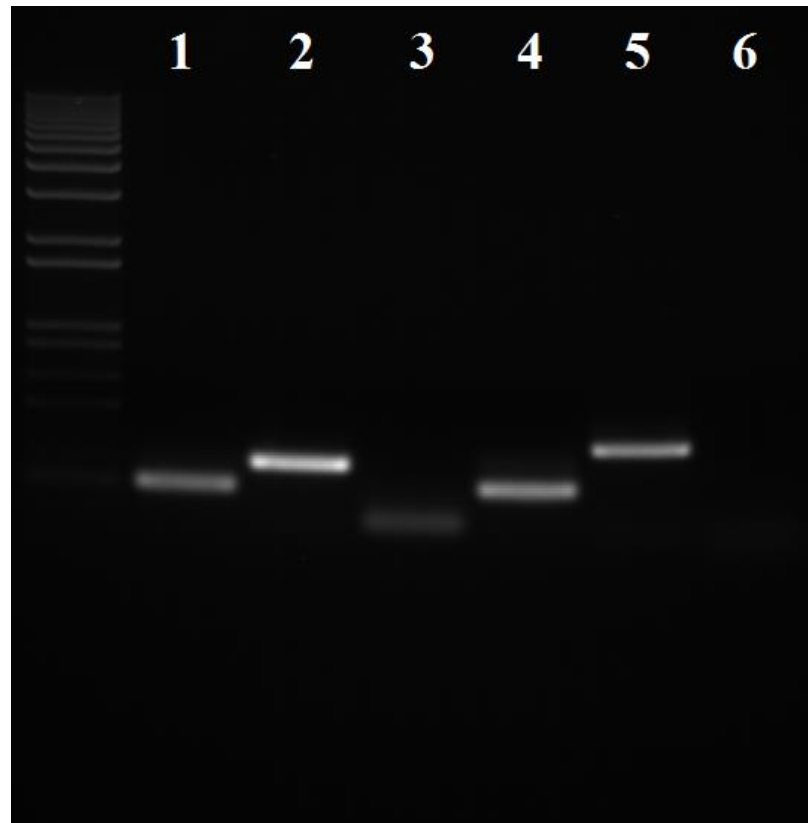


Figura 11. PCR de LEA-1, -4 e -12. Ladder: 1kb (Invitrogen). 1: gene LEA-1 amplificado com os *primers* LEA1-F e LEA1-R1. 2: gene LEA-1 amplificado com os *primers* LEA1-F e LEA1-R2. 3: gene LEA-4 amplificado com os *primers* LEA4-F e LEA4-R1. 4: gene LEA-4 amplificado com os *primers* LEA4-F e LEA4-R2. 5: gene LEA-4 amplificado com os *primers* LEA4-F e LEA4-R3. 6: gene LEA-12 amplificado com os *primers* LEA12-F1 e LEA12-R1.

6 DISCUSSÃO

As proteínas LEA foram primeiramente identificadas cerca de 30 anos atrás, em plantas de algodão, quando sementes foram observadas na fase tardia de desenvolvimento, momento em que o embrião passa a ser tolerante a dessecação (Dure e Galau, 1981). Após essa publicação surgiram vários outros trabalhos demonstrando a existência em diversas outras espécies de plantas (Dure *et al.*, 1989; Wise, 2003). A princípio, pensava-se que essas proteínas pertencessem apenas às plantas, porém Browne e colaboradores (2002) identificaram um gene no nematódeo *Aphelenchus avenae*, fornecendo evidências de que plantas e animais anidrobióticos poderiam utilizar mecanismos, em alguns aspectos, semelhantes para a proteção contra a dessecação (Browne *et al.*, 2002). A partir de então, a presença de proteínas LEA tem sido identificadas em outros invertebrados (Browne, 2004; Hand *et al.*, 2007; Tyson *et al.*, 2007; Denekamp *et al.*, 2010) e também em algumas bactérias (Battista *et al.*, 2001). Em todos os casos, até o momento, essa classe de proteínas parece estar associada com a conferência de resistência à dessecação. Indo ao encontro do relatado na literatura, os dados levantados por este trabalho também confirmam a participação de uma proteína LEA (LEA-12) no processo de anidrobiose, uma vez que o seu silenciamento acabou por promover um decréscimo significativo na porcentagem de viabilidade do nematoide *P. superbus*.

Os dados obtidos demonstram que o silenciamento por 17 dias não foi capaz de promover alterações na viabilidade da espécie-modelo estudada. Como não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na viabilidade dos nematódeos durante o teste de pré-dessecação, evidencia-se que os genes LEA analisados não são essenciais para a sobrevivência de *P. superbus*. Portanto, a redução observada na porcentagem de viabilidade do grupo LEA-12 silenciado se deve unicamente aos efeitos causados pelo silenciamento deste gene LEA no processo de anidrobiose.

Ao analisarmos a viabilidade pós-dessecação nota-se que a taxa de viabilidade dos grupos experimentais decresceram, porém apenas LEA-12 teve uma diferença estatisticamente significativa. Isto confirma a participação de LEA-12 no processo de anidrobiose em *P. superbus*. No que se refere aos genes codificadores de LEA-1 e LEA-4, a diferença estatística não foi significativa ao ponto de podermos afirmar que estes estão envolvidos no processo de anidrobiose. Uma possível explicação seria uma redundância funcional, *i.e.*, outras proteínas executariam o mesmo papel de LEA-1 e/ou LEA-4. Portanto, o *knockdown* de LEA-1 ou LEA-4 não seria suficiente para causar uma redução drástica na viabilidade destes grupos experimentais durante dessecação extrema. A hipótese da participação de LEA-1 e LEA-4, portanto, não foi confirmada, porém diversos estudos mostram que proteínas LEA estão diretamente associadas com a resistência ao estresse hídrico (Bewley, 1992; Xu *et al.*, 1996; Bajaj *et al.*, 1999; Babu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012; Handel *et al.*, 2013)

O silenciamento de LEA-12 mostrou-se não ser capaz de levar a alterações morfológicas nas estruturas observadas: integridade da cutícula, estrutura geral da faringe e vulva (bem como fenótipo multivulva) ou outras alterações mais marcantes e evidentes. Adicionalmente, não foram notadas alterações no que se refere ao diâmetro dos vermes em qualquer estágio de desenvolvimento (não houve diferença estatisticamente significativa). Deve-se ressaltar que não se encontra dados na literatura a relação dos efeitos do *knockdown/knockout* de proteínas LEA na morfologia dos organismos anidrobiotos.

Uma possível explicação para LEA-12 não estar envolvida em alterações morfológicas e comportamentais é a de que, em condições normais de umidade relativa, as proteínas LEA mantêm sua conformação inativa, alcançando a sua forma ativa quando em condições de estresse hídrico (Hand *et al.*, 2011; Chakrabortee *et al.*, 2012).

No que se refere ao comportamento, também não foram notadas diferenças com respeito a fenótipos já bem caracterizados na literatura para *Caenorhabditis elegans* como: “*roller*” (giro em torno do próprio eixo), “*twitching*” (contração muscular descordenada), “*long and thin*” (alongamento e diminuição do diâmetro dos vermes), imobilização ou letargia. Geralmente, os genes envolvidos nesses fenótipos comportamentais alterados (*roller*, *twitching*, imobilização) estão associados a defeitos na cutícula, contração muscular e controle nervoso em *C. elegans*, organismo modelo em que os fenótipos comportamentais estão bem caracterizados (Avery *et al.*, 1993; Timmons e Fire, 1998; Johnstone, 2000). Visto que não se observou alguma mudança comportamental nos vermes silenciados para LEA-12, podemos concluir que LEA-12 não está envolvida nessas vias biológicas, ainda que não saibamos qual a sua exata função. A comparação realizada com os fenótipos de *C. elegans* justifica-se, pois além de estar bem caracterizada na literatura, não se encontram muitos dados para *P. superbus*.

Quanto à análise do desenvolvimento, estudos realizados com *Arabidopsis thaliana* demonstraram que as proteínas LEA são importantes para o correto desenvolvimento do embrião, uma vez que o *knockout* de uma proteína LEA dessas plantas exibiu sementes com um fenótipo de desidratação prematura e maturação antes do esperado (Manfre *et al.*, 2006). Uma possível explicação para essa alteração no desenvolvimento (maturação antes do esperado) é que a indução do gene LEA é realizada quando ocorre um aumento no nível de ácido abscísico (fitormônio responsável pela dormência das sementes) (Bostock e Quatrano, 1992; Vicent *et al.*, 2000). Com o aumento do ácido abscísico no embrião, ocorre o início da dormência da semente. De alguma forma, o acúmulo de proteínas LEA na semente atua como uma sinalização para que os eventos que levam a maturação da semente sejam promovidos. O *knockout* de

LEA atuaria na maneira inversa, atuando em vias que, de alguma forma, promova uma sinalização de que esta semente encontra-se madura. O interessante é que um resultado semelhante pode ser notado no presente estudo. Se observarmos a figura 6, notaremos uma maior porcentagem de adultos presentes em t168 no grupo silenciado para LEA-12 (quando comparado ao grupo controle, GFP). Além disso, houve também uma diminuição do número de larvas no estágio L1 no mesmo período t168. Uma hipótese para tal observação é a de que, de forma análoga ao acontecido no estudo da *Arabidopsis* LEA-knockout, pode ser que a síntese de LEA-12 seja induzida por algum hormônio, e seu aumento/diminuição (de proteína na forma inativa) participe, de alguma forma, na sinalização para que ocorra a muda de uma fase para outra.

Somando-se, então, as análises de morfologia, desenvolvimento e comportamento, os dados indicam que o gene LEA-12 atue de uma forma que não altere o fenótipo de uma maneira expressiva, já que não foram notadas diferenças significativas entre o grupo controle e experimental, exceto pela diferença nas porcentagens de vermes adultos e larvas L1 durante t168, bem como a taxa de viabilidade pós-dessecação, o que confirma a hipótese do envolvimento do gene LEA-12 no processo de anidrobiose.

Para confirmar molecularmente o silenciamento, utilizamos a técnica de RT-PCR com posterior resolução em gel de agarose. Como indicado na seção resultados, não foi possível obter a confirmação molecular do silenciamento de LEA-12, pois não houve a amplificação da sequência desejada com nenhuma das seis combinações de *primers* (dois *forward* e três *reverse*) testados. Considerando que em testes anteriores com *primers* específicos para LEA-1 e LEA-4 observou-se amplificação destes genes, descartamos qualquer problema com nas reações de PCR. Uma possível explicação para este problema é a existência de diferentes clones parciais de LEA-12 (todos eles

clonados no vetor L4440). Neste sentido, os *primers* desenhados e utilizados em neste trabalho seriam adequados para um outro clone, impossibilitando assim a análise molecular do nosso.

Para melhor caracterização do gene aqui confirmado como participante da via de anidrobiose, mais análises devem ser feitas sobre seu perfil de expressão ao longo do desenvolvimento do organismo, bem como caracterizar sua função no processo de anidrobiose, uma vez que as proteínas LEA fazem parte de uma grande classe de proteínas que possui grande plasticidade funcional, como por exemplo, escudo molecular, proteção enzimática, proteção de membranas, etc (Tunnacliffe e Wise, 2007; Liu *et al.*, 2011; Chakrabortee *et al.*, 2012; Furuki *et al.*, 2012).

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- As proteínas LEA-1, LEA-4 e LEA-12 não são essenciais para a sobrevivência de *P. superbis* em condições normais de umidade relativa.
- A proteína LEA-12 participa da via de anidrobiose do nematódeo estudado, com um papel importante no processo, uma vez que a porcentagem de viabilidade dos vermes silenciados teve uma média de 15,69%.
- Na ausência de estresses abióticos, o silenciamento de LEA-12 não promove drásticas alterações na morfologia e comportamento dos vermes. Isto se deve à não participação em determinadas vias biológicas como controle muscular, nervoso e defeitos da cutícula do verme.
- No tempo de desenvolvimento de 168h após a eclosão, observa-se uma diferença na porcentagem de adultos e também de larvas L1 nos vermes silenciados para LEA-12. Esta diferença poderia ser devido, por exemplo, a participação desta proteína nos eventos de muda entre uma fase larval e a seguinte.

8. BIBLIOGRAFIA

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

Anderson, E., Lochhead, J. H., Lochhead, M. S., Huebner, E. (1970). The origin and structure of the tertiary envelope in thick-shelled eggs of the brine shrimp, *Artemia*. *Journal of ultrastructure research*, 32(5), 497-525.

Avery, L., Bargmann, C. I., Horvitz, H. R. (1993). The *Caenorhabditis elegans* unc-31 gene affects multiple nervous system-controlled functions. *Genetics*, 134(2), 455-464.

Bajaj, S., Targolli, J., Liu, L. F., Ho, T. H. D., Wu, R. (1999). Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Molecular Breeding*, 5(6), 493-503.

Baulcombe, D. (1999). Viruses and gene silencing in plants. In *100 Years of Virology* (pp. 189-201). Springer Vienna.

Beltrán-Pardo, E., Jönsson, K. I., Wojcik, A., Haghdooost, S., Harms-Ringdahl, M., Bermúdez-Cruz, R. M., Villegas, J. E. B. (2013). Effects of Ionizing Radiation on Embryos of the Tardigrade *Milnesium tardigradum* at Different Stages of Development. *PloS one*, 8(9), e72098.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366.

Bertolani, R., Guidetti, R., Jonsson, I. K., Altiero, T., Boschini, D., Rebecchi, L. (2004). Experiences with dormancy in tardigrades. *Journal of Limnology*, 63(1s), 16-25.

Bewley, J. D., Oliver, M. J. (1992). Desiccation tolerance in vegetative plant tissues and seeds: protein synthesis in relation to desiccation and a potential role for protection and repair mechanisms. In *Water and Life* (pp. 141-160). Springer Berlin Heidelberg.

Billi, D., Potts, M. (2002). Life and death of dried prokaryotes. *Research in microbiology*, 153(1), 7-12.

Bostock, R. M., & Quatrano, R. S. (1992). Regulation of Em Gene Expression in Rice Interaction between Osmotic Stress and Absciscic Acid. *Plant physiology*, 98(4), 1356-1363.

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94.

Browne, J., Tunnacliffe, A., Burnell, A. (2002). Anhydrobiosis: plant desiccation gene found in a nematode. *Nature*, 416(6876), 38-38.

Browne, J. A., Dolan, K. M., Tyson, T., Goyal, K., Tunnacliffe, A., Burnell, A. M. (2004). Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryotic Cell*, 3(4), 966-975.

Chakrabortee, S., Tripathi, R., Watson, M., Schierle, G. S. K., Kurniawan, D. P., Kaminski, C. F., Wise, M. J., Tunnacliffe, A. (2012). Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Molecular BioSystems*, 8(1), 210-219.

Chandra Babu, R., Zhang, J., Blum, A., David Ho, T. H., Wu, R., Nguyen, H. T. (2004). HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa*) via cell membrane protection. *Plant Science*, 166(4), 855-862.

Chiu, P. L., Kelly, D. F., Walz, T. (2011). The use of trehalose in the preparation of specimens for molecular electron microscopy. *Micron*, 42(8), 762-772.

Clegg, J. S. (1973). Do dried cryptobioties have a metabolism? In *Anhydrobiosis* (ed. JH Crowe and JS Clegg), 141-146.

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

Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54(1), 579-599.

Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual review of physiology*, 60(1), 73-103.

de Castro, A. G., Bredholt, H., Strøm, A. R., Tunnacliffe, A. (2000). Anhydrobiotic engineering of gram-negative bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 66(9), 4142-4144.

Degma, P., Bertolani, R., Guidetti, R. (2010). Actual checklist of Tardigrada species (Ver. 13: 01-06-2010).

Denekamp, N. Y., Reinhardt, R., Kube, M., & Lubzens, E. (2010). Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in nondesiccated, encysted, and diapausing embryos of rotifers. *Biology of reproduction*, 82(4), 714-724.

Denlinger, D. L. (2002). Regulation of diapause. *Annual review of entomology*, 47(1), 93-122.

Dure, L., Galau, G.A. (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry* 20, 4162–4168

Dure III, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T. H. D., Mundy, J., Quatrano, R., Sung, Z. R. (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 12(5), 475-486.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes development*, 15(2), 188-200.

Eleutheria, E. C., de Araujo, P. S., Panek, A. D. (1993). Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1156(3), 263-266.

Eroglu, A., Toner, M., Toth, T. L. (2002). Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertility and sterility*, 77(1), 152-158.

Evangelista, C. S. S. (2011). Estudo da participação de uma peroxiredoxina na via de anidrobiose através de interferência por RNA (RNAi). Monografia de Conclusão de Curso, Departamento de Biologia, FFCLRP USP, Ribeirão Preto.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.

França, M. B., Panek, A. D., Eleutherio, E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. 146: 621-631.

Furuki, T., Shimizu, T., Chakrabortee, S., Yamakawa, K., Hatanaka, R., Takahashi, T., Kikawada, T., Okuda, T., Mihara, H., Tunnacliffe, A., Sakurai, M. (2012). Effects of group 3 LEA protein model peptides on desiccation-induced protein aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1824(7), 891-897.

Gadd, G. M., Chalmers, K., Reed, R. H. (1987). The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters, 48(1), 249-254.

García de Castro, A., Tunnacliffe, A. (2000). Intracellular trehalose improves osmotolerance but not desiccation tolerance in mammalian cells. FEBS letters, 487(2), 199-202.

Giard, A. 1894 L'anhydrobiose ou ralentissement des phénomènes vitaux. C. R. Soc. Biol. Paris 46, 497–500.

Gilbert, J. J. (1974). Dormancy in rotifers. Transactions of the American Microscopical Society, 490-513.

Guidelli, G. V., (2011). Análise dos efeitos do silenciamento de uma glutathione peroxidase no nematóide anidrobiótico *Panagrolaimus superbus*. Monografia de Conclusão de Curso, Departamento de Biologia, FFCLRP USP, Ribeirão Preto.

Guidetti, R., Rizzo, A. M., Altiero, T., Rebecchi, L. (2012). What can we learn from the toughest animals of the Earth? Water bears (tardigrades) as multicellular model organisms in order to perform scientific preparations for lunar exploration. Planetary and Space Science, 74(1), 97-102.

Guo, N., Puhlev, I., Brown, D. R., Mansbridge, J., Levine, F. (2000). Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnology*, 18(2), 168-171.

Hamilton, A. J., Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441), 950-952.

Hand, S. C., Jones, D., Menze, M. A., & Witt, T. L. (2007). Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 307(1), 62-66.

Hand, S. C., Menze, M. A., Toner, M., Boswell, L., Moore, D. (2011). LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annual Reviews of Physiology*, 73, 115-134.

Handel, S. C., Patil, Y., Li, S., Charkraborty, N., Borcar, A., Menze, M. A., Boswell, L. C., Moore, D. Toner, M. (2013). Diapause and Anhydrobiosis in Embryos of *Artemia franciscana*: Metabolic Depression, LEA Proteins and Water Stress. *Cryobiology and Cryotechnology*, 59(1), 41-46.

Higa, L. M., Womersley, C. Z. (1993). New insights into the anhydrobiotic phenomenon: the effects of trehalose content and differential rates of evaporative water loss on the survival of *Aphelenchus avenae*. *Journal of Experimental Zoology*, 267(2), 120-129.

Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in plant science*, 6(9), 431-438.

Honda Y., Tanaka M. and Honda S.(2010).Trehalose extends longevity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell*, doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00582.x

Horikawa D. D., Kunieda T. , Abe W. , Watanabe M. , Nakahara Y. , Yukuhiro F. , Sakashita T. , Hamada N. , Wada S. , Funayama T. , Katagiri C. , Kobayashi Y. , Higashi S. , Okuda T. (2008). Establishment of a rearing system of the extremotolerant tardigrade *Ramazzottius varieornatus*: a new model animal for astrobiology. *Astrobiology*. 8(3):549-56.

Hounsa, C. G., Brandt, E. V., Thevelein, J., Hohmann, S., Prior, B. A. (1998). Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*, 144(3), 671-680.

Ingram, J., Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 377-403.

Iturriaga, G. (2008). The LEA proteins and trehalose loving couple: a step forward in anhydrobiotic engineering. *Biochem. J*, 410, e1-e2.

Johnstone, I. L. (2000). Cuticle collagen genes: Expression in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Genetics*, 16(1), 21-27.

Jönsson, K. I., Rabbow, E., Schill, R. O., Harms-Ringdahl, M., Rettberg, P. (2008). Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current biology*, 18(17), R729-R731.

Kawasaki, H., Taira, K., Wadhwa, R. (2004). World of small RNAs: from ribozymes to siRNA and miRNA. *Differentiation*, 72(2-3), 58-64.

Keilin, D. (1959). The Leeuwenhoek Lecture: The problem of anabiosis or latent life: History and current concept. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 150(939), 149-191.

Kikawada, T., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Iwata, K. I., Watanabe, M., McGee, B., Okuda, T. (2006). Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(1), 56-61.

Lapinski, J., Tunnacliffe, A. (2003). Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers. *FEBS letters*, 553(3), 387-390.

Lebkuecher, J. G., Eickmeier, W. G. (1993). Physiological benefits of stem curling for resurrection plants in the field. *Ecology*, 1073-1080.

Li, D., He, X. (2009). Desiccation induced structural alterations in a 66-amino acid fragment of an anhydrobiotic nematode late embryogenesis abundant (LEA) protein. *Biomacromolecules*, 10(6), 1469-1477.

Li, S., Chakraborty, N., Borcar, A., Menze, M. A., Toner, M., Hand, S. C. (2012). Late embryogenesis abundant proteins protect human hepatoma cells during acute desiccation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

MacRae, T. H. (2003, October). Molecular chaperones, stress resistance and development in *Artemia franciscana*. In *Seminars in cell developmental biology* (Vol. 14, No. 5, pp. 251-258). Academic Press.

Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M., Sugimoto, A. (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current Biology*, 11(3), 171-176.

Manfre, A. J., Lanni, L. M., & Marcotte, W. R. (2006). The Arabidopsis group 1 LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT protein ATEM6 is required for normal seed development. *Plant physiology*, 140(1), 140-149.

Manzanera M, Garcia de Castro A, Tondervik A, Rayner-Brandes M, Strom AR, Tunnacliffe A. (2002). Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol*. 68(9):4328-33.

Nelson, D. R. (2002). Current status of the Tardigrada: evolution and ecology. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 652-659.

Novina, C. D., Sharp, P. A. (2004). The rai revolution. *Nature*, 430(6996), 161-164.

Raoul, C., Abbas-Terki, T., Bensadoun, J. C., Guillot, S., Haase, G., Szulc, J., Henderson, C. E., Aebischer, P. (2005). Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nature Medicine*, 11(4), 423-428.

Oliver, M. J., Tuba, Z., Mishler, B. D. (2000). The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology*, 151(1), 85-100.

Persson, D., Halberg, K. A., Jørgensen, A., Ricci, C., Mobjerg, N., Kristensen, R. M. (2011). Extreme stress tolerance in tardigrades: surviving space conditions in low earth orbit. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49(s1), 90-97.

Reardon, W., Chakrabortee, S., Pereira, T. C., Tyson, T., Banton, M., Dolan, K., Culleton, B. A., Wise, M. J., Burnell, A. M., Tunnacliffe, A. (2010). Expression profiling and cross-species RNA interference (RNAi) of desiccation-induced transcripts in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *BMC molecular biology*, 11(1), 6.

Rocheleau, C. E., Downs, W. D., Lin, R., Wittmann, C., Bei, Y., Cha, Y. H., Mussa, A., Priess, J.R., Mello, C. C. (1997). Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 90(4), 707-716.

Sallon, S., Solowey, E., Cohen, Y., Korchinsky, R., Egli, M., Woodhatch, I., Orit, Simchoni, Kislev, M. (2008). Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science*, 320(5882), 1464-1464.

Sano, F., Asakawa, N., Inoue, Y., Sakurai, M. (1999). A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. *Cryobiology*, 39(1), 80-87.

Schokraie, E., Hotz-Wagenblatt, A., Warnken, U., Mali, B., Frohme, M., Förster, F., Schnölzer, M. (2010). Proteomic analysis of tardigrades: towards a better understanding of molecular mechanisms by anhydrobiotic organisms. *PloS one*, 5(3), e9502.

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

Shannon, A. J., Tyson, T., Dix, I., Boyd, J., Burnell, A. M. (2008). Systemic RNAi mediated gene silencing in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus*. *BMC molecular biology*, 9(1), 58.

Somero, G. N., Yancey, P. H. (1997). Osmolytes and Cell-Volume Regulation: Physiological and Evolutionary Principles. *Comprehensive Physiology*.

Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689), 1434-1437.

Suárez, R., Wong, A., Ramírez, M., Barraza, A., Orozco, M. D. C., Cevallos, M. A., Lara, M., Hernández, G., Iturriaga, G. (2008). Improvement of drought tolerance and

grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(7), 958-966.

Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., Mello, C. C. (1999). The *rde-1* Gene, RNA Interference, and Transposon Silencing in *C. elegans*. *Cell*, 99(2), 123-132.

Tanguay, J. A., Reyes, R. C., Clegg, J. S. (2004). Habitat diversity and adaptation to environmental stress in encysted embryos of the crustacean *Artemia*. *Journal of biosciences*, 29(4), 489-501.

Timmons, L., Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395(6705), 854-854.

Tollete, D., Jaquinod, M., Mangavel, C., Passirani, C., Saulnier, P., Manon, S., Teyssier, E., Payet, N., Macherel, D. (2007). Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *The Plant Cell Online*, 19(5), 1580-1589.

Triantaphyllidis, G., Abatzopoulos, T., Sorgeloos, P. (1998). Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal of biogeography*, 25(2), 213-226.

Tunnacliffe, A., García de Castro, A., Manzanera, M. (2001). Anhydrobiotic engineering of bacterial and mammalian cells: is intracellular trehalose sufficient? *Cryobiology*, 43(2), 124-132.

Tunnacliffe, A., Lapinski, J., McGee, B. (2005). A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. In *Rotifera X* (pp. 315-321). Springer Netherlands.

Tunnacliffe, A., Wise, M. J. (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94(10), 791-812.

Tyson, T., Reardon, W., Browne, J. A., Burnell, A. M. (2007). Gene induction by desiccation stress in the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* reveals parallels with drought tolerance mechanisms in plants. *International journal for parasitology*, 37(7), 763-776.

Van Stappen, G., Lavens, P., Sorgeloos, P. (1998). Effects of hydrogen peroxide treatment in *Artemia* cysts of different geographical origin. *Archiv für Hydrobiologie Special Issues Advances in Limnology*, 52, 281-296.

Vicient, C. M., Hull, G., Guilleminot, J., Devic, M., Delseny, M. (2000). Differential expression of the *Arabidopsis* genes coding for Em-like proteins. *Journal of Experimental Botany*, 51(348), 1211-1220.

Watanabe, M., Sakashita, T., Fujita, A., Kikawada, T., Horikawa, D. D., Nakahara, Y., Wada, S., Funayama, T., Hamada, N., Kobayashi, Y., Okuda, T. (2006). Biological effects of anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki* on radiation tolerance. International journal of radiation biology, 82(8), 587-592.

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

Watanabe, M. (2006). Anhydrobiosis in invertebrates. Applied Entomology and Zoology, 41(1), 15-31.

Welnicz, W., Grohme, M. A., Kaczmarek, L., Schill, R. O., Frohme, M. (2011). Anhydrobiosis in tardigrades—the last decade. Journal of Insect Physiology, 57(5), 577-583.

Wolkers, W. F., Tablin, F., Crowe, J. H. (2002). From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular Integrative Physiology, 131(3), 535-543.

Wright, J. C. (2001). Cryptobiosis 300 years on from van Leuwenhoek: What have we learned about tardigrades? Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology, 240(3), 563-582.

Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T. H. D., Wu, R. (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant physiology*, 110(1), 249-257.

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566), 1214-1222.