

ÁGUA: DESAFIOS DA SOCIEDADE

(CATEGORIA MESTRE E DOUTOR)

Título: *Reduzindo drasticamente nossa dependência de água na agricultura através da anidrobiose.*

Linha de pesquisa: *1- Gestão inovadora dos recursos hídricos aplicados ao uso do solo e a gestão ambiental.*

Autora: *Cláudia Carolina Silva Evangelista - ccseangelista@gmail.com*

Mestranda do programa de pós-graduação em Genética da FMRP, USP.

Orientador: *Prof. Dr. Tiago Campos Pereira - tiagocampospereira@ffclrp.usp.br*

Professor Doutor de Genética do Dpto. de Biologia, FFCLRP, USP.

Instituição de vínculo da autora: Dpto. de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP). Avenida Bandeirantes 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP. CEP 14040 901.

Instituição onde se desenvolveu a pesquisa: Laboratório de Genética Molecular da Anidrobiose, Dpto. de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP). Avenida Bandeirantes 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP. CEP 14040 901. Telefone: (16) 3602 3818.

Palavras- chave: (i) anidrobiose, (ii) seca, (iii) estresse hídrico, (iv) dessecação, (v) animação suspensa.

A seca é um problema que atinge o Brasil anualmente, prejudicando milhões de brasileiros. Investimentos exorbitantes de bilhões de reais são feitos todos os anos pelo Governo Federal em medidas que no geral são apenas paliativas. As perdas econômicas são enormes, tanto para os grandes produtores, quanto para a agricultura familiar.

Em períodos de estiagem, como gerir de maneira inteligente os escassos recursos hídricos entre o consumo humano, animal, produção de energia e agricultura?

Intrigantemente, algumas espécies animais e vegetais desenvolveram uma estratégia extrema, sofisticada e bela de sobrevivência a seca extrema: a *anidrobiose* (“vida sem água”). Uma vez que estas espécies entram neste estado ametabólico elas tornam-se as estruturas de natureza biológica mais resistentes que se tem conhecimento, suportando não apenas a dessecação extrema, mas também diversos fatores abióticos.

Nossa proposta de *gestão inovadora dos recursos hídricos aplicada ao uso do solo* visa à otimização do uso das águas em período de secas. Vislumbramos uma estratégia sem precedentes: a preservação de plantações através da anidrobiose. Neste cenário, os recursos hídricos seriam **redirecionados, i.e., preferencialmente investidos** no consumo humano, animal e produção de energia. Não haveria a necessidade de se utilizar volumes incalculáveis de água para irrigar as grandes extensões de terra em uso agrícola, uma vez que estas plantas poderiam ser reversivelmente preservadas a seco pelo processo de anidrobiose.

Para isto, objetivamos nesse projeto científico **identificar** genes associados ao processo de anidrobiose em uma espécie modelo. Este é o primeiro passo e o mais fundamental para a engenharia anidrobiótica de plantações.

Realizamos uma triagem funcional via RNAi de ~100 genes possivelmente associados a anidrobiose, uma abordagem inédita no mundo. Identificamos algumas das principais etapas no processo de anidrobiose: transporte controlado de água, reparação de danos oxidativos, controle do enovelamento de proteínas e ativação de sinalização celular/proteica. Estes resultados ajudam a compreender as bases moleculares da anidrobiose e podem ser utilizados para o uso da engenharia anidrobiótica na agricultura.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O impacto das secas na agricultura

Neste ano de 2013, o Brasil enfrenta a pior seca registrada nos últimos 50 anos, superando o ano passado em que já havia batido o seu recorde (Organização das Nações Unidas, 08/04/2013). Segundo dados do Governo Federal, 1.415 municípios sofrem os efeitos da seca, afetando quase 22 milhões de brasileiros. A falta de chuvas atinge mais de 90% dos municípios do semiárido ultrapassando a extensão das 1.135 cidades que o compõem (Folha de São Paulo, 02/04/2013).

O semiárido brasileiro, principalmente o chamado *Polígono das secas*, é a área mais atingida estendendo-se por oito Estados da Região Nordeste (AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN e SE), além do norte de Minas Gerais, totalizando uma extensão territorial de mais de 980 quilômetros quadrados.

Em virtude da situação cada vez mais agravante, o Governo Federal está investindo R\$ 32 bilhões em obras estruturais, com o intuito de garantir o abastecimento de água de forma definitiva, como barragens, canais, adutoras e estações elevatórias. Além disso, no início do mês de abril foi anunciado o investimento de mais R\$ 9 bilhões em ações para enfrentar à estiagem (Folha de São Paulo, 02/04/2013).

As perdas diretas nas lavouras da região chegaram aos R\$ 3,6 bilhões em 2012 e afetaram tanto grandes produtores de cana-de-açúcar, soja, algodão e tabaco quanto agriculturas familiares, que são responsáveis pela produção dos principais alimentos consumidos pela população brasileira, como: mandioca, feijão e milho, esta última sendo também principal fonte de alimentação de bovinos.

No início do ano, Aldemir Freire (economista-chefe do IBGE em Natal) fez um balanço da situação econômica, comparando valor e quantidades de dez culturas (feijão, castanha de caju, arroz, mandioca, milho, algodão, banana, cana de açúcar, café e soja) produzidas na região em 2011 e 2012. O tombo estimado, a valores de 2011, foi de 18%: R\$ 20,1 bilhões para R\$ 16,5 bilhões, sendo que feijão (R\$ 961 milhões) e milho (R\$ 532 milhões) lideraram as perdas. “*O prejuízo equivale, por exemplo, a quase metade do valor total da obra de transposição do rio São Francisco, a mais importante da região, orçada em R\$ 8,2 bilhões*”. E a situação fica cada vez mais crítica, com a previsão de ainda mais seca entre junho de 2013 e fevereiro de 2014 (Folha de São Paulo, 05/05/2013).

1.2 A anidrobiose

Apesar de todo este cenário gerado pela seca, quando voltamos nosso olhar para a biologia e seus inúmeros fenômenos (desenvolvimento, evolução, cognição, socialização) encontramos processos admiravelmente belos. Um deles se destaca por ser fascinante, contraintuitivo e cujas aplicações biotecnológicas são revolucionárias: a *anidrobiose*.

A anidrobiose (*an-*: sem; *hidro*: água; *bios*: vida - “vida sem água” em uma tradução livre) é uma estratégia extrema, sofisticada e bela de sobrevivência que algumas espécies utilizam diante da seca extrema (extensivamente revisto em Keilin, 1959; Crowe, 1971; Tunnacliffe e Lapinski, 2003). Ela pode ser observada, por exemplo, em larvas de uma espécie de mosca africana chamada *Polypedilum vanderplanki* (fig. 1). Os ovos desta mosca são comumente depositados em pequenas poças de água sobre as rochas. Ao eclodirem, as larvas iniciam uma fase de desenvolvimento rápido. Contudo o sol causticante e as altas temperaturas podem facilmente secar estas pequenas piscinas, dando um fim ao ambiente aquoso fundamental para o crescimento das larvas. Diante deste cenário *aterrador* para estes organismos, observando minuto após minuto a evaporação da água que os cercam, aproximando-se inexoravelmente da morte por desidratação, as larvas de *P. vanderplanki* fazem algo espetacular aos olhos de qualquer observador. Estes organismos aparentemente frágeis, provavelmente vistos como pequenas vítimas do acaso, respondem ao desafio desencadeando uma série de respostas moleculares, fisiológicas e anatômicas que permitirão que eles entrem literalmente no *limbo da existência*: transformar-se-ão em estruturas semelhantes a *cristais biológicos* (Watanabe *et al.*, 2006; revisto em Cornette e Kikawada, 2011).

Estas larvas irão desidratar-se de maneira controlada e simultaneamente acumular proteínas e açúcares dentro de suas células. A água, que mantinha a estrutura das proteínas e a integridade das membranas celulares, agora se vai. Mas estas proteínas e moléculas de açúcar irão formar um biovidro (do inglês, *bioglass*) que substituirá a matriz aquosa por uma matriz sólida (Sakurai, 2008).

Quando toda a poça de água tiver secado e eventuais outras espécies habitantes deste pequeno oásis tiverem morrido por dessecação, as larvas de *P. vanderplanki* estarão adormecidas, em um estado de animação suspensa - a anidrobiose. Elas não estarão mais vivas, pois não há metabolismo; contudo, elas

também não morreram. Justifica-se, portanto um de seus nomes “quironomídeo adormecido” (*sleeping chironomid*).

Após dias e dias de calor insuportável vem a tão esperada chuva. Esta benção dos céus traz consigo a semente da vida: a água. Ao cair sobre as rochas, formam-se novamente as pequenas poças de água. Em uma destas várias pedras estão as larvas dessecadas de *P. vanderplanki*. As pequenas moléculas de água entram neste corpo retorcido, escuro, que mais parece um grão de areia ou uma partícula de sujeira, como pó, e fazem reviver *P. vanderplanki*. Este processo de reidratação faz estas larvas saírem desse estado de suspensão da vida e as traz de volta à vida, retomando todo o metabolismo, fisiologia e desenvolvimento.

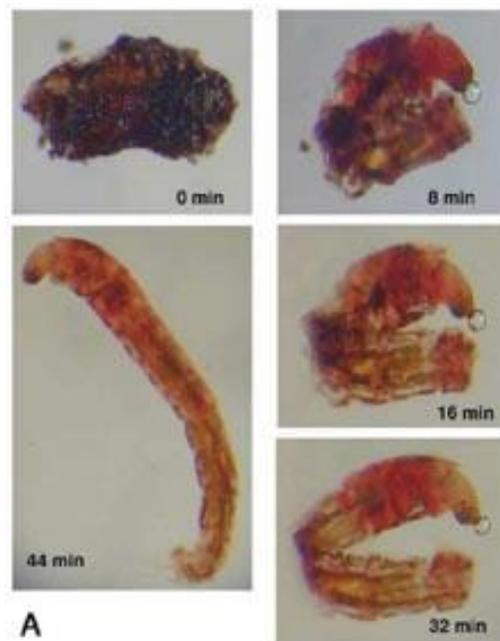


Figura 1. Larva do quironomídeo *Polypedilum vanderplanki* em processo de ressurreição que dura 44 minutos (retirado de Watanabe *et al.*, 2006).

Fosse apenas pelo fato de evitar a morte através da cristalização, a anidrobiose já seria impressionante. Mas ela é muito mais do que isto. Esta bela e breve descrição revela apenas parte de um mecanismo muito mais fabuloso, que ocorre não apenas nestas larvas, mas em diversas outras espécies anidrobióticas, tais como alguns vermes (*Panagrolaimus superbus*) e certas espécies de plantas da ressurreição (*Myrothamnus flabellifolia* e *Selaginella lepidophylla*, fig. 2).



Figura 2. Superior: Espécime adulto do verme de vida livre anidrobiótico *Panagrolaimus superbus*, modelo deste estudo. **Inferior:** Planta da ressurreição, *Selaginella lepidophylla*, em dois estados: viva e em anidrobiose.

Uma vez que estas espécies entram neste estado ametabólico (*i.e.*, em fase sólida) eles tornam-se as estruturas de natureza biológica mais resistentes que se tem conhecimento. Eles não apenas suportam a dessecação extrema, mas agora também são resistentes a temperaturas extremas. Pode-se, por exemplo, mergulhar estes animais em nitrogênio líquido (-196°C) e eles não perdem a viabilidade. A anidrobiose gera uma estabilidade tão grande que, a imersão em hélio líquido (269°C negativos, temperatura que não ocorre em nenhum ambiente natural de nosso planeta) não é letal. Nem mesmo impressionantes -273,1°C (apenas 0,05 grau Celsius acima do zero absoluto) foram capazes de danificar organismos em estado de anidrobiose (Becquerel, P. 1950a; 1950b). Estes mesmos organismos resistem se forem aquecidos a 100°C logo após o congelamento; eventualmente suportando até 151°C (revisto em Crowe, 1971).

Este estado de anidrobiose, ou resistência à dessecação extrema, reserva em suas mangas outras surpresas. Ela torna os animais resistentes também à radiação ultravioleta e raios X. Estes tipos de radiação, que são letais para toda e qualquer forma de vida que conhecemos, não são problemas para os organismos que estão em anidrobiose. Estudos revelaram que, de fato, a radiação danifica o DNA destes organismos, mas eles são capazes de literalmente reconstruir todo seu genoma em poucas horas (Zahradka, 2006).

Por fim, a anidrobiose confere também resistência ao vácuo e a pressão hidrostática extrema. Vermes expostos a uma pressão de ~6.000 atmosferas mantiveram viabilidade (Seki e Toyoshima, 1998). A maioria dos animais e plantas na superfície da Terra estão expostos a uma pressão de apenas 1 atmosfera.

1.3 A proposta: reduzir as perdas na agricultura através de estratégias baseadas na anidrobiose

Nossa proposta se baseia em uma estratégia revolucionária e sem precedentes: a preservação de plantações através da anidrobiose. Este conceito permitiria uma gestão inovadora e inteligente dos recursos hídricos durante a seca, direcionando-os para outros setores (consumo humano, animal e geração de energia) (fig. 3).

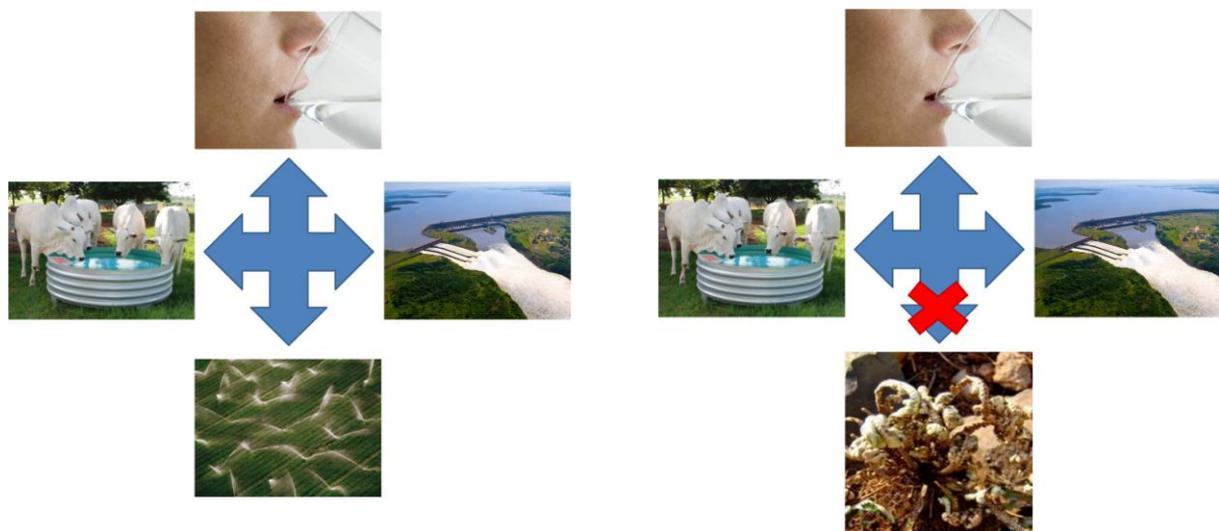


Figura 3. Nossa proposta de gestão inovadora de águas aplicada ao uso do solo em tempos de seca. Esquerda: em tempos de chuvas, os quatro setores (consumo humano, animal, irrigação e geração de energia) são bem abastecidos com água. Direita: em períodos de estiagem, a preservação das plantações via anidrobiose não apenas evitaria as perdas na agricultura como também possibilitaria o redirecionamento dos recursos hídricos.

Apesar de todo o desenvolvimento em tecnologias de previsão do tempo e de distribuição da água entre as grandes regiões do Brasil, ano após anos temos presenciado a perda de lavouras em períodos de estiagem prolongada. Tratam-se de perdas não apenas para a população geral, refletidas em uma redução da oferta de produtos agrícolas e aumento de seus preços, mas também para os agricultores que, em muitos casos, perdem tudo: o investimento, as terras e seus bens para cobrir os empréstimos obtidos nos bancos.

Vemos nos noticiários os casos de agricultores relatando a situação limítrofe de suas plantações. A lavoura começa a definhando perante a redução da água no solo e o pequeno e médio agricultor diz: “se não chover em poucos dias, toda minha lavoura será perdida!” Semanas depois a chuva vem, mas é tarde demais: tudo foi perdido poucos dias antes - as plantas sucumbiram à desidratação.

Nosso projeto vislumbra um *cenário semelhante*, mas com *desfecho bem diferente*. Imaginamos plantações protegidas por estratégias baseadas em anidrobiose. Plantas que não morreriam diante da seca, mas entrariam em animação suspensa. Não podemos controlar o tempo/clima, mas poderíamos resguardar nossas lavouras em meio à estiagem.

Visualize um pequeno produtor que espera colher seus frutos 100 dias após a semeadura. Apenas 14 dias antes da colheita uma dramática alteração no tempo ocorre e uma forte estiagem se estabelece. No cenário em que estamos acostumados, o agricultor assim como sua colheita estariam fadados à desgraça. Contudo, se compreendêssemos as bases moleculares da anidrobiose - quais são os genes responsáveis por este processo de cristalização, de resistência à dessecação extrema - poderíamos tornar as plantas de interesse econômico em organismos anidrobióticos. Nesta história, apenas 14 dias antes da colheita, a plantação não morreria, mas simplesmente entraria em animação suspensa: totalmente resistente à seca. Quando a chuva chegasse, com 4 semanas (ou mais) de atraso, a água traria a vida de volta às plantas e a colheita estaria garantida.

1.4 Os desafios para a engenharia anidrobiótica

Os segredos para o desenvolvimento deste cenário são dois: (i) descobrir as bases genéticas da anidrobiose e (ii) aplicar este conhecimento, tornando plantas comuns em anidrobióticas.

O **primeiro desafio** é a **base da engenharia anidrobiótica** sendo, portanto, o **tema do projeto aqui apresentado**: identificar os genes responsáveis por conferir resistência à dessecação extrema. Uma vez que conheçamos estes genes e, conseqüentemente, as proteínas por eles codificadas, compreenderemos como a anidrobiose ocorre.

O segundo aspecto se refere a utilizar este conhecimento para converter plantas de interesse comercial (setor alimentício, têxtil, etc) em resistentes à seca. Duas das possíveis estratégias para se alcançar este objetivo são: (a) *modificação genética* das plantas, para expressarem estes genes durante períodos de seca, fazendo-as entrar em animação suspensa como processos endógenos ou (b) *pulverização nas plantações com uma solução de cristalização* - composta pelos açúcares e proteínas naturalmente acumulados em animais e plantas anidrobióticas.

Plantas transgênicas expressando genes associados à anidrobiose seriam naturalmente resistentes à seca, pois estariam aptas a se cristalizar em condições desfavoráveis. Por outro lado, a pulverização de colheitas com uma solução de cristalização também seria factível devido a duas evidências: uma natural e uma experimental.

A evidência natural deriva das mitocôndrias de animais anidrobióticos. Elas são organelas com membranas e genomas próprios, cujos genes não codificam proteínas associadas à anidrobiose. Pelo contrário, todos os dados atuais indicam que estes genes são majoritariamente nucleares. Contudo, quando um animal entra em anidrobiose, todas suas estruturas celulares são preservadas, incluindo as mitocôndrias. Este fato evidencia que, uma estrutura não anidrobiótica (a mitocôndria) “imersa” em um meio de cristalização (citoplasma da célula do anidrobioto) é capaz de internalizar os açúcares e proteínas disponíveis no citoplasma, os quais promoverão sua cristalização junto com o restante da célula.

A segunda evidência é de natureza experimental. A imersão de partículas virais (utilizadas para vacinação) em uma *solução baseada em anidrobiose* foi capaz de preservar a validade (*i.e.*, imunogenicidade e título) desta vacina por meses a 45°C (Alcock *et al.*, 2010). Estes dados demonstram claramente que, mesmo não codificando os genes associados à anidrobiose, os vírus e mitocôndrias podem ser conservados a seco após simples imersão em meio contendo componentes acumulados em anidrobiotos. O mesmo poderia ser tentado em plantas.

1.5 O uso da Interferência por RNA (RNAi) para identificação de genes associados à anidrobiose

A técnica de interferência por RNA (RNAi) permite o silenciamento (inativação) de genes de maneira específica através de moléculas de RNA dupla fita (dsRNAs). A inativação de um determinado gene pode promover uma alteração fenotípica na célula ou no organismo; por exemplo, a planta teria uma estatura menor. Portanto, indiretamente a RNAi permite identificar a função dos genes: neste caso, o gene silenciado está relacionado com o crescimento vegetal.

Recentemente a RNAi foi utilizada também para a identificação de genes associados à anidrobiose no verme anidrobiótico *Panagrolaimus superbus*. A estratégia nestes estudos é simples: os vermes são alimentados com bactérias expressando dsRNAs, que promoverão a inativação de um determinado gene. Em seguida os vermes são dessecados por 24 horas, posteriormente reidratados e a viabilidade determinada (Reardon *et al.*, 2010).

Se inativarmos um gene não relacionado ao processo de anidrobiose, a população de vermes conseguirá entrar em animação suspensa e, após reidratação, apresentará uma elevada viabilidade (grupo controle).

Entretanto, se inativarmos um gene envolvido no processo de anidrobiose, a população de vermes não conseguirá entrar em animação suspensa e, após reidratação, apresentará uma queda de viabilidade em relação ao grupo controle. Pode-se, assim, identificar de maneira funcional quais genes são associados à anidrobiose.

Nosso interesse é utilizar a engenharia anidrobiótica para fins agrônômicos e existem plantas anidrobióticas que poderiam ser usadas como modelo de pesquisa para a identificação de genes associados à dessecação extrema. Contudo, decidimos utilizar o verme nematoide de vida livre *Panagrolaimus superbus* (fig. 2) como modelo de pesquisa por uma série de motivos.

Primeiramente, devido à sua simplicidade como um modelo de pesquisa: ele é muito pequeno (~1 mm de comprimento) consequentemente demandando pouco espaço, seu ciclo de vida é curto (de reprodução rápida) e possui baixo custo de manutenção. Adicionalmente, ele é uma espécie muito próxima ao *C. elegans*, que é um modelo de pesquisa mundialmente utilizado, para o qual diversas técnicas já estão bem estabelecidas e descritas. Adicionalmente, a utilização de RNAi demanda dois elementos: (i) que a espécie seja susceptível ao silenciamento e (ii) que o

genoma ou o transcriptoma da espécie sejam conhecidos. Nenhuma planta anidrobiótica cumpre ambas as premissas, mas *P. superbus* sim. Por fim, o processo de anidrobiose entre espécies diferentes compartilha diversos aspectos comuns, como a acumulação de açúcares e proteínas do tipo LEA (Browne *et al.*, 2002), sugerindo que via de anidrobiose deste nematoide poderia ser utilizada para a engenharia anidrobiótica em plantas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos gerais deste projeto são: (i) identificar os genes responsáveis pela anidrobiose no verme nematoide *P. superbus* e (ii) conhecer mais profundamente o papel de um destes genes no processo de resistência à dessecação extrema.

2.2 Objetivos específicos

1) Testar duas novas estratégias de RNAi em *P. superbus*:

- via **imersão** em solução contendo moléculas longas de RNA dupla fita (dsRNAs)

- via **imersão** contendo moléculas curtas de RNA dupla fita (siRNAs de 27 pb)

2) Utilizar estas estratégias de RNAi para avaliar o envolvimento de ~100 genes candidatos ao processo de anidrobiose no vermes *P. superbus*.

3) Realizar ensaios de resistência ao estresse oxidativo em animais cujo gene peroxiredoxina foi silenciado por RNAi. Este ensaio visa conhecer o papel deste gene específico no processo de resistência à dessecação extrema.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção dos nematoides

Populações de *P. superbus* foram mantidas em incubadoras a 21°C, no escuro, em placas com NGM ágar (*Nematode Growth Medium*, meio de crescimento de nematoides) e alimentadas com uma camada de *Escherichia coli* (linhagem OP50).

3.2 Avaliação da imersão como um meio para desencadear RNAi

Três siRNAs de 27 pb ("substratos de dicer") contra o gene *ifb-1* (filamento intermediário B 1; número de acesso EU368943) e três contra actina (número de acesso EU368944.1) de *P. superbus* foram desenhados utilizando o programa gratuito *Strand Analysis* (Pereira, *et al.*, 2007). Estas moléculas são duplexes de RNA de 27 pb, com dois nucleotídeos despareados na porção 3' e um grupo fosfato na extremidade 5'. Como controle negativo, foi desenhado um substrato de dicer contra GFP (número de acesso X83960). Os substratos de dicer foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

Os vermes (*P. superbus*) foram coletados das placas de manutenção e lavados com tampão M9. Em seguida, os vermes foram transferidos para tubos de 1,5 mL contendo diferentes concentrações de substratos de dicer (0,1 µM, 1 µM e 10 µM, em triplicata) e mantidos no escuro durante 24 horas, sem agitação, a 21°C. Os volumes finais de todos os tubos foram de 100 µL. Os vermes foram imersos em soluções contendo uma das seguintes moléculas: i) substrato de dicer contra GFP (controle negativo); ii) substrato de dicer contra *ifb-1* 1; iii) substrato de dicer contra *ifb-1* 2; iv) substrato de dicer contra *ifb-1* 3; v) uma mistura equimolar substratos de dicer contra *ifb-1* 1, 2 e 3, ou vi) uma mistura equimolar de substrato de dicer contra actina 1, 2 e 3.

Alternativamente, cerca de 200 vermes foram imersos em uma solução de 35 µL de dsRNA 5K, dsRNA 11K ou dsRNA GFP (0,86 µg/µL, diluído em 5 mM Tris-HCl).

3.3 Triagem de ~100 genes potencialmente envolvidos na anidrobiose em *P. superbus*

Seleção dos alvos. Um total de 99 alvos potenciais (além de 3 controles positivos) foi considerado para a triagem (anexo 1). O primeiro grupo englobava 34 cDNAs relacionados a quinases, obtidos a partir de uma população mista de *P. superbus* e clonados no vetor pDNR-Lib. Estes alvos foram selecionados porque os processos de sinalização são supostamente muito importantes para os animais entrarem em anidrobiose. O segundo grupo abrangia genes que se mostraram super expressos durante a anidrobiose em outras espécies animais (Adhikari *et al*, 2009; Haegeman *et al*, 2009; Mali *et al*, 2010; Schokraie *et al*, 2010; Boschetti *et al*, 2012; Eyres *et al*, 2012; Schokraie *et al*, 2012; Tyson *et al*, 2012; Yamaguchi *et al*, 2012). Um grupo de 65 alvos foi selecionado considerando os seguintes aspectos: (i) genes que demonstraram serem induzidos em uma espécie (ou mais) durante anidrobiose, (ii) existência de homólogo(s) dentro da biblioteca EST de *P. superbus*. Conseqüentemente a tabela do anexo I engloba 102 genes: 99 genes candidatos e 3 controles positivos.

Interferência por RNA. RNAi foi desencadeada por imersão de 200-600 vermes por 24 horas, no escuro, em soluções com dsRNAs na concentração final de 0,8 µg/mL (volume de imersão: 35 µL) ou substratos de dicer (siRNAs de 27 pb) na concentração final de 1 µM (volume de imersão: 100 µL). Os dsRNAs foram produzidos por transcrição *in vitro*, usando uma abordagem modificada desenvolvido por Yu e colaboradores (2002). Resumidamente, 500 nanogramas de cDNA alvo (clonado em pDNR-Lib vector) foram submetidas a PCR utilizando primers que ancoram ao vector e apresentam uma cauda do promotor T7. A PCR foi realizada com a GoTaq DNA Polymerase (Promega), em 50 µL de volume de reação, sob as seguintes condições: 94°C por 5 minutos (um ciclo), 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto (33 ciclos), 72°C por 10 minutos (1 ciclo). Os produtos resultantes da amplificação foram precipitados com isopropanol, ressuspensos com água ultrapura e submetidos à transcrição *in vitro* (TranscriptAid T7 High yield transcription kit; ThermoScientific), seguida por tratamento com DNase I, de acordo com as instruções do fabricante. Os dsRNAs foram então diluídos para 1 µg/µL com água ultrapura e Tris-HCl (pH 6,8) foi adicionado a uma concentração final de 5 mM.

Outros 14 genes de *P. superbus* foram amplificados por RT-PCR (exatamente como descrito para GP41, item 3.4) e clonados no vetor pCR 2.1 TOPO (Invitrogen). Estas sequências clonadas foram utilizadas como moldes para uma segunda rodada de PCR, do mesmo modo como foi feito com pDNR-Lib, mas agora utilizando primers gene-específicos e T7. Os fragmentos amplificados resultantes puderam ser facilmente utilizados para a transcrição *in vitro*, tal como descrito antes.

Cinquenta substratos de dicer foram desenhados como descrito anteriormente, com a adição de grupos de fosfato nas porções 5' terminais e foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Confirmação do silenciamento gênico por RT-PCR. A confirmação do silenciamento gênico foi realizada por RT-PCR, exatamente como descrito para GP41 (item 3.4). Os primers utilizados para dsRNAs (5K e 11K) e siRNAs (ifb-1) foram desenhados no programa “Gene Runner” e adquiridos da Sigma-Aldrich.

Desafio de dessecação. Para identificar os genes relacionados à anidrobiose, os vermes foram submetidos ao desafio de dessecação de acordo com Shannon *et al.* (2005). Resumidamente, os vermes silenciados foram imobilizados em membranas filtrantes Supor 0,45 µm (Sigma-Aldrich) por filtração a vácuo com um funil de Sartorius, colocados em tubos de 1,5 mL e, em seguida, submetido às seguintes condições: 98% de umidade relativa (UR) por 24 horas numa solução saturada de sulfato de cobre (a menos que indicado de outra forma), 10% de UR por 24 horas em sílica gel seca e pré-hidratação em 100% de umidade relativa por 24 horas em vapor de água destilada. A reidratação foi realizada por 24 horas pela adição de 1,5 mL de tampão M9 às amostras. A porcentagem de sobrevivência foi analisada por coloração com Eritrosina B e microscopia.

Ensaio de letalidade. A fim de determinar se a diminuição na sobrevivência foi devido à interrupção do processo de anidrobiose ou a uma letalidade não relacionada, as análises de sobrevivência foram também realizados depois do silenciamento por imersão (mas sem dessecação).

3.4 RNAi e confirmação molecular do silenciamento gênico de GP41

Um cDNA com similaridade com a peroxiredoxina (designada GP41, número de acesso no GenBank GR881190), clonado no vetor L4440 (resistência à ampicilina), em *E. coli* HT115 foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Ann Burnell (Universidade Nacional da Irlanda).

Esta linhagem bacteriana é usada para RNAi via alimentação (designada dsGP41) e foi crescida em tubos de 50 mL com LB líquido e ampicilina (50 µg/mL) sob agitação (210 rpm, 37°C) durante a noite. Subsequentemente, os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 3500 g. Os *pellets* foram ressuspensos com 600 µL de LB líquido com ampicilina e vertidos em placas de *Petri* contendo NGM ágar e IPTG (1 mM). As placas foram deixadas durante dois dias a temperatura ambiente para induzir a expressão de dsRNA pelas bactérias.

Os vermes foram então coletados das placas de manutenção com OP50 e lavados com tampão M9. Em seguida, uma pequena quantidade de vermes foi transferida para as placas contendo as bactérias expressando dsRNA contra GP41. Eles ficaram por quase 15 dias se alimentando para garantir o silenciamento de toda a população. Bactérias HT115 contendo GFP clonado no vector L4440 (L4440::GFP, referido como "GFP") foram usadas como controle negativo. Populações alimentadas com bactérias L4440::GP41 são referidas como "dsGP41", "silenciadas para GP41" ou "GP41-silenciadas". O termo "GP41" foi utilizada para se referir ao gene correspondente/cDNA.

A confirmação molecular do silenciamento gênico foi realizada por RT-PCR. O gene da β -actina foi utilizado como controle interno (número de acesso EU368944). Inicialmente, o RNA total foi extraído a partir dos vermes usando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, EUA) de acordo com as orientações do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria e posteriormente diluídas em água ultra pura (livre de RNase) para se obter uma concentração final de 1 µg/µL. Todas as amostras de RNA foram pré-tratadas com DNase I (Fermentas, Maryland, EUA), seguindo uma versão modificada do protocolo do fabricante: uma unidade de enzima (30 minutos a 37°C), seguido pela adição de uma outra unidade de enzima (30 minutos a 37°C). As reações de transcrição reversa (RT) foram realizadas utilizando o kit ImProm-IITM (Promega, Madison, EUA) e primers randômicos (500 ng), em um volume final de 20 µL, de acordo com o fabricante. A seguir, a PCR foi realizada utilizando o kit GoTaq^R DNA polimerase (Promega, Madison, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A PCR foi realizada utilizando 2 µL de RT e 25 picomoles de cada primer gene-específico (forward e reverso) para "GP41" ou β -actina (tubos separados) em um volume final de 50 µL.

Todas as reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: 94°C por 5 minutos (1 ciclo), 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto (33 ciclos), 72°C por 10 minutos (1 ciclo). Os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose 1% corado com Sybr Safe (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A densitometria das bandas foi feita utilizando o software Image J. A normalização dos dados foi feita dividindo-se o valor obtido para o gene silenciado pelo valor encontrado para β -actina.

3.5 Avaliação do papel de GP41 como antioxidante

Os vermes GP41-silenciados (em tampão M9) foram submetidas a estresse oxidativo por adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , Synth) para as seguintes concentrações finais: 0 μ M (zero), 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM, 10 mM, 20 mM e 40 mM. O volume final de todos os tubos foi de 100 μ L. Estes valores foram selecionados de acordo com estudos anteriores em *C. elegans* (Larsen, 1993).

As amostras foram, em seguida, homogeneizadas por agitação suave e incubadas a 20°C durante 24 horas. Após este período, o sobrenadante foi removido e 1 mL de Eritrosina B (0,4% w/v) foi adicionada e deixada durante quatro horas. Os vermes foram então lavados três vezes com tampão M9 e as porcentagens de sobrevivência foram determinadas por microscopia (N = 200 para cada grupo).

3.6 As análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicata (ou quadruplicata) e os dados são apresentados como médias e desvios-padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando "Teste T", "One-Way ANOVA" (com Tukey ou Dunn de post-hoc) ou "Mann-Whitney Rank Sum" com o software SigmaStat. As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Desencadeamento eficaz de RNAi por imersão dos vermes em duplexes longos e curtos de RNA

Embora a alimentação seja um eficiente método para o desencadeamento de RNAi em *P. superbus*, a imersão em duplexes de RNA apresenta algumas vantagens para triagens de média escala. Portanto, decidimos determinar se imergir *P. superbus* em soluções contendo duplexes de RNA longos (>100 pb) ou curtos (27 pb) também seria uma estratégia eficaz para promover o silenciamento. Conforme podemos verificar por RT-PCR (fig. 4), um silenciamento bem sucedido foi alcançado via imersão em dsRNAs longos por 24 h. Da mesma forma, duplexes de RNA com 27 pb (conhecidos como substratos de dicer) também desencadearam RNAi a 0,1 μ M e 1 μ M (fig. 4). Como esperado, os substratos de dicer contra regiões distintas de um mesmo alvo promoveram diferentes efeitos de silenciamento (Holen *et al.*, 2002). Adicionalmente, um efeito dose-resposta pode ser observado, o aumento em 10 vezes na concentração de todos os substratos de dicer aumentou o efeito do silenciamento. Contudo, a imersão a 10 μ M levou a efeitos inespecíficos (dados não mostrados).

A eficiência da RNAi também foi avaliada no nível fenotípico, ambos ifb-1 e actina influenciam na mobilidade dos vermes e, como esperado, quase 85% dos vermes de *P. superbus* imersos em um mix de substratos de dicer para ifb-1 (1 μ M) por 24 h apresentaram redução dos movimentos. Do mesmo modo, quase 54% e 38% daqueles imersos em mix de actina (1 μ M) mostraram redução ou ausência de movimentos, respectivamente (dados não mostrados). Por outro lado, cerca de 90% dos vermes do grupo controle (GFP, 1 μ M) apresentaram movimentação normal. Estes resultados claramente confirmam os dados moleculares anteriores, mostrando o sucesso em desencadear RNAi por imersão em substratos de dicer.

Imagem retirada devido a exigência para publicação em revistas internacionais indexadas

Figura 4. Desencadeamento bem sucedido RNAi por imersão em *P. superbus*. Imergindo vermes em soluções com dsRNAs longos (superior) ou substratos de dicer (inferior) são formas eficazes para desencadear o silenciamento gênico, como comprovado por RT-PCR. ("a" $p < 0,05$ One-way ANOVA on Ranks, Tukey pós-teste).

4.2 Identificação de genes relacionados à anidrobiose em *P. superbus*

Com o intuito de identificar genes associados ao processo de resistência à dessecação extrema em *P. superbus*, realizamos uma análise em média escala via RNAi (por imersão). Selecionamos um painel de ~100 genes, a maioria deles com base em estudos de transcriptoma e proteoma de espécies anidrobióticas. Deste painel, quase um terço (35 genes) apresentou alterações na porcentagem de sobrevivência após silenciamento e desafio de dessecação. A maioria destes genes (34) apresentou reduções significativas na viabilidade (de 24% a 64%)(fig. 5), evidenciando o seu envolvimento no processo de anidrobiose. Curiosamente, o silenciamento de um alvo (*heat shock protein 70*) levou a um ligeiro aumento na sobrevivência (12%) comparado ao controle. Estas reduções na sobrevivência não são devido à letalidade, uma vez que a sobrevivência pós-silenciamento permanece inalterada (dados não mostrados). A imersão dos vermes tanto em dsRNA, quanto siRNA, foi efetiva em promover silenciamento gênico.

A maioria dos alvos (25 genes) com diminuição da viabilidade está relacionada com a sinalização celular (quinases), sendo que três são proteínas ribossomais e outros sete não estão diretamente relacionados (enovelamento de proteínas, degradação de proteínas, transporte de água e outros).

Imagens retiradas devido a exigência para publicação em revistas internacionais indexadas.

Figura 5A.

A legenda das figuras 5 (A-F) se encontra abaixo da última imagem (F). Os nomes de cada gene alvo estão listados na tabela do anexo 1.

5B.

A legenda das figuras 5 (A-F) se encontra abaixo da última imagem (F). Os nomes de cada gene alvo estão listados na tabela do anexo 1.

5C.

A legenda das figuras 5 (A-F) se encontra abaixo da última imagem (F). Os nomes de cada gene alvo estão listados na tabela do anexo 1.

5D.

A legenda das figuras 5 (A-F) se encontra abaixo da última imagem (F). Os nomes de cada gene alvo estão listados na tabela do anexo 1.

5E.

A legenda das figuras 5 (A-F) se encontra abaixo da última imagem (F). Os nomes de cada gene alvo estão listados na tabela do anexo 1.

5F.

Figura 5. Identificação de genes relacionados à anidrobiose em *P. superbus* via RNAi seguido por dessecação. A-F) Seis conjuntos distintos de experimentos foram conduzidos; trinta e cinco genes apresentaram mudanças nas porcentagens de sobrevivência após silenciamento e dessecação, além dos três controles positivos (dsRNA 29C, 30C e 31C). Quase todos (34) demonstraram ser importantes para o processo de anidrobiose, tal como avaliado pela diminuição na sobrevivência. (* $p < 0,05$). Os nomes de cada gene alvo estão listados na tabela do anexo 1.

4.3 Confirmação do envolvimento do gene da peroxiredoxina na anidrobiose

O silenciamento gênico via RNAi (por alimentação) foi confirmado por RT-PCR, revelando uma média de redução de 71% dos transcritos para GP41, comparado ao grupo controle (GFP; fig. 6). Antes da dessecação, o silenciamento gênico não teve efeito na viabilidade dos nematoides, evidenciando que GP41 não é um gene essencial (dado não mostrado). Após a dessecação, todos os grupos mostraram um aumento na mortalidade (fig. 7), mas o grupo experimental foi significativamente mais sensível: 66% de redução da viabilidade quando comparado ao controle. Estes dados demonstram pela primeira vez, a participação da peroxiredoxina (GP41) na anidrobiose do nematoide. Isto é consistente com o estresse oxidativo como sendo um componente significativo de vários vetores de estresse sentidos por nematoides dessecados, como indicado em outros organismos.

Imagens retiradas devido a exigência para publicação em revistas internacionais indexadas

Figura 6. Peroxiredoxina está envolvida com anidrobiose em *P. superbus*. A análise molecular por RT-PCR revelou uma redução média de 71% nos transcritos de GP41 dos vermes submetidos a RNAi por alimentação em relação ao grupo controle (* $p \leq 0,05$). Grupo “GP41 *knockdown*” é constituído por vermes cujo gene GP41 foi silenciado.

Figura 7. Testes de sobrevivência após a dessecação extrema. GP41 silenciando promoveu uma redução de 66% na porcentagem de sobrevivência quando comparado ao grupo controle (* $p \leq 0,05$) (N = 200, para cada tratamento). Grupo “GP41 *knockdown*” é constituído por vermes cujo gene GP41 foi silenciado.

4.4 GP41 atua como um antioxidante

Uma vez que GP41 codifica uma enzima relacionada ao combate ao estresse oxidativo, decidimos investigar se seu envolvimento na anidrobiose estava ligado a uma função específica. Grupos controle e experimental foram expostos a diferentes concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio por 24 horas. Para o grupo silenciado para GP41, uma clara redução na sobrevivência (comparada ao controle) pode ser observada a 10 mM de H₂O₂ e foi mais intensa em concentrações maiores (20 mM e 40 mM) (fig. 8). Estes resultados evidenciam claramente que GP41 é importante no controle de danos mediados por espécies reativas de oxigênio (ROS), uma situação esperada durante a desidratação.

Imagens retiradas devido a exigência para publicação em revistas internacionais indexadas

Figura 8. Enzima GP41 combate estresse oxidativo. O silenciamento deste gene reduz o limiar de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio. Reduções estatisticamente significativas são encontradas em vermes silenciados para GP41 em 10 mM ("a" p <0,05). Grupo "GP41 *knockdown*" é constituído por vermes cujo gene GP41 foi silenciado.

5. DISCUSSÃO

5.1 Identificação de genes associados à anidrobiose

A identificação de genes relacionados à anidrobiose é a peça central no desenvolvimento da engenharia anidrobiótica: a conversão de amostras biológicas (células, tecidos, órgãos e plantas) sensíveis a desidratação em resistentes à dessecação extrema. Isto traria imensos avanços em vários aspectos da agricultura (preservação de plantações diante de períodos de seca) assim como na medicina (transporte de vacinas a temperatura ambiente; preservação de células, tecidos e órgãos para transplante, etc). *P. superbus* é uma espécie anidrobiótica bem estudada e a validação de genes supostamente relacionados à anidrobiose é possível pela utilização de RNAi.

O recente transcriptoma de *P. superbus* permite agora a investigação e identificação funcional de genes relacionados à anidrobiose. Isto pode ser feito através da utilização de RNAi por alimentação. Embora seja uma estratégia eficaz,

esta abordagem requer a clonagem de genes alvo em vetores adequados. Assim, as análises de maior escala podem tirar vantagem de uma outra abordagem: a RNAi por imersão, que é mais rápida (24 h, em vez de dias em placas de alimentação), utiliza menos espaço (tubos de 0,2 - 1,5 mL, em vez de placas de 60 - 90 milímetros) e exige menos consumíveis. Por isso, decidimos testar se *P. superbis* também é passível de RNAi por imersão com dsRNAs longos (300-800 pb). Os nossos resultados mostram claramente que é, de fato, possível silenciar genes nesta espécie modelo utilizando este método alternativo.

Decidimos então investigar se substratos de dicer (dsRNAs de 27 pb) também são capazes de desencadear RNAi por imersão. Esta abordagem seria muito mais interessante, uma vez que estas moléculas podem ser adquiridas comercialmente, evitando assim os passos de laboratório (PCR seguida por transcrição *in vitro*). Estudos anteriores haviam mostrado que Sid-1, uma proteína transmembrana expressa na faringe de *C. elegans* é responsável pela absorção de dsRNAs longos (Feinberg *et al.*, 2003) e de siRNAs curtos em concentrações elevadas (Issa *et al.*, 2005.; Shih *et al.*, 2009). Portanto, também testamos esta abordagem e as nossas análises moleculares revelaram que os substratos de dicer também são capazes de promover o silenciamento de genes em *P. superbis* por imersão em soluções de duplexes de RNA a 0,1 μ M. Esta estratégia apresenta um efeito dose-resposta, uma vez que as soluções a 1 μ M são mais eficientes. E, como esperado, se a quantidade de duplexes de RNA é demasiadamente elevada (10 μ M), efeitos inespecíficos começam a surgir (Grimm *et al.*, 2006). Neste último cenário, a maioria dos grupos apresentou aumentos inadvertidos na expressão gênica (inclusive no grupo controle). Além disso, o sucesso da RNAi por imersão com substratos de dicer também foi confirmado por meio de análises fenotípicas, que mostrou uma mudança completa na movimentação normal (grupo GFP) para movimentação reduzida (ifb-1mix) ou redução/ausência de movimentos (act-mix).

Em seguida, começamos a avaliar a participação de ~100 genes no processo de anidrobiose em *P. superbis* via RNAi por imersão (com dsRNAs ou RNAs de 27 pb). Estes dados revelaram que o nosso processo de seleção, focando em genes previamente identificados em outras espécies anidrobióticas, foi satisfatória, pois obtivemos um número elevado de resultados positivos (cerca de 1/3), nesta seleção de alvos totalmente aleatórios.

Um desses genes codifica uma aquaporina (AQP), que é uma classe de proteínas que permitem o transporte de água através da bicamada fosfolipídica. Duas AQPs já haviam sido clonadas a partir de *P. vanderplanki* (Campbell *et al.*, 2008). PvAQP1 demonstrou ser expressa por todo o corpo de *P. vanderplanki* e é induzida durante a anidrobiose, evidenciando que pode ser responsável pelo controle da perda de água (durante a desidratação), assim como no processo de rápida reidratação. Nossos dados evidenciam que tais processos mediados pela aquaporina são também importantes em *P. superbus*.

Três alvos (proteína ribossômica 40S S12, proteína ribossômica 60S L4 e proteína ribossômica 60S L7a) estão envolvidos na tradução, evidenciando um papel da síntese de proteínas durante a dessecação e/ou reidratação. Este achado é esperado uma vez que se observa uma acumulação intensa de proteínas, tais como LEA, durante a dessecação em muitas espécies anidrobióticas distintas (Browne *et al.*, 2002). É importante notar que, embora a tradução seja um processo básico e geral, o silenciamento de cada alvo individualmente não afeta a sobrevivência, provavelmente indicando um papel especial para estas proteínas durante a anidrobiose.

Aldoceto redutases (AKRs) são enzimas metabolizadoras da fase I que catalisam reduções dependentes de NAD(P)H em grupos carbonil, para produzir álcoois primários e secundários com uma grande variedade de substratos, incluindo os aldeídos alifáticos e aromáticos, cetonas e xenobióticos (Mindnich e Penning, 2009). AKRs humanas podem alterar uma vasta gama de substratos, incluindo medicamentos, substâncias cancerígenas e desintoxicar aldeídos reativos formados a partir de substâncias tóxicas exógenas, por exemplo, aflatoxinas, substâncias tóxicas endógenas, e aquelas formados a partir da quebra de peróxidos lipídicos (Jin e Penning, 2007). Portanto, uma vez que as AKRs são enzimas reguladoras de estresse (osmótico, eletrofílico e oxidativo), elas provavelmente desempenham um papel na anidrobiose por desintoxicar o meio celular durante a dessecação/desidratação.

As ciclofilinas exibem uma atividade de isomerase peptidil-prolil *cis-trans* que reduz a barreira de energia de rotação em torno da ligação peptidil-prolil. Esta atividade catalítica demonstrou aumentar a taxa de enovelamento de proteínas, bem como o processamento de proteínas (Picken *et al.*, 2002), eventos que podem ser

relevantes na anidrobiose devido à alterações estruturais causadas nas proteínas pela perda de água e de alteração de pH .

O envolvimento da subunidade alfa do proteassoma no processo de anidrobiose revela um aspecto interessante do processo. O proteassoma é responsável pela degradação de quaisquer proteínas erroneamente dobradas (Groll e Potts, 2011) e, como a água é perdida durante a desidratação, alterações estruturais nos polipeptídeos podem ser eventos comuns. Portanto, o proteassoma desempenha um importante papel de limpeza do ambiente celular das proteínas mal enoveladas (não-funcionais ou tóxicas), permitindo a recuperação a partir do estado seco.

Da mesma forma, a autofagia, um processo lisossomo-associado de descarte de partes danificadas das células, mostra-se relevante em *P. superbus*. A identificação de uma "proteína relacionada à autofagia 2B" sugere que a desidratação e dessecação promovem danos consideráveis aos constituintes celulares.

AN1 zinc finger é um domínio normalmente presentes nas proteínas de resposta ao estresse abiótico em plantas (frio, dessecação, salinidade, submersão, metais pesados e ferimento), bem como em proteínas que regulam a resposta imune em animais (Vij e Tyagi, 2008). Consequentemente, a identificação de uma proteína com domínio *AN1 zinc finger* no nematoide anidrobiótico era esperada. No entanto, é interessante notar que A20/AN1 também estão envolvidas na ubiquitinação para degradação proteossômica (Wertz *et al*, 2004;. Heyninck e Beyaert, 2005;. Hishiya *et al*, 2006).

Tomados em conjunto, peroxiredoxina, subunidade alfa do proteassoma, domínio *AN1 zinc finger* (*AN1-like zinc finger protein*), aldoceto redutase, ciclofilina e "proteína relacionada à autofagia 2B" sugerem um papel importante dos sistemas de reparação/limpeza celulares durante a anidrobiose.

No entanto, o maior subconjunto funcional de alvos associados ao processo de anidrobiose em *P. superbus* identificado em nossa triagem pertence a classe de quinases. Vinte e cinco proteínas quinases relacionadas foram identificadas em nossa análise, entre os quais: a tirosina-quinase, a caseína quinase I, a isoenzima adenilato-quinase 1 e a serina/treonina-proteína-quinase Nek7. Este achado indica que os rápidos processos de entrada/saída anidrobiose dependem extremamente da sinalização mediada por quinases. Considerando-se que *P. superbus* é um

estrategista rápido, isto é, não exige pré-condicionamento para entrar em anidrobiose (Shannon *et al.*, 2005), o elevado número de quinases identificadas, pode sugerir que o proteoma do nematoide permanece em um estado "quase pronto" para responder estresse hídrico extremo. Quando começa a desidratação, as proteínas ainda necessárias são sintetizadas e as quinases simplesmente ativam os polipeptídeos que já estavam presentes no ambiente celular. Esta estratégia é, sem dúvida, muito eficiente, promovendo uma resposta mais rápida e reduzindo a dependência da tradução.

Nossa triagem identificou algumas das principais etapas no processo de anidrobiose em *P. superbus*: transporte controlado de água, reparação de danos oxidativos, controle do enovelamento de proteínas e ativação de sinalização celular/proteica. Estes resultados ajudam a compreender a base molecular da anidrobiose e podem ser utilizados para melhorar a tolerância à desidratação em plantas, isto é, os passos iniciais do uso engenharia anidrobiótica da agricultura.

5.2 Compreendendo as bases fisiológicas da anidrobiose: investigação do papel biológico de um gene associado a anidrobiose

Organismos anidrobióticos enfrentam condições drásticas de estresse hídrico, que causam efeitos deletérios na célula, devido principalmente aos danos oxidativos (França *et al.*, 2007). O estresse oxidativo refere-se a uma condição biológica em que há um desequilíbrio na concentração de espécies oxidantes sobre os antioxidantes (Sies, 2000). Por causa disto, os organismos desenvolveram mecanismos adaptativos responsáveis pela desintoxicação celular, envolvendo sistemas que reparam os danos causados por estes compostos pró-oxidantes (Michiels *et al.*, 1994). Inserido neste grupo de agentes de defesa contra os radicais livres está a enzima peroxiredoxina (GP41), cujo envolvimento na anidrobiose decidimos avaliar e melhor caracterizar.

Testes de viabilidade foram realizados em vermes após 15 dias de alimentação com bactérias expressando dsGP41. Uma vez que não foram observadas diferenças entre o grupo experimental e grupo controle (todos eles exibidos perto de 100% de sobrevivência), concluímos que a GP41 não é um gene essencial. Mais importante ainda, qualquer redução na percentagem de

sobrevivência após a dessecação seria, por consequência, devido ao envolvimento de GP41 anidrobiose, ao invés de funções celulares básicas.

Consequentemente, as reduções estatísticas significativas detectadas na viabilidade pós-dessecação do grupo silenciado para GP41, quando comparado ao grupo controle, mostraram pela primeira vez que a peroxiredoxina está associada com anidrobiose em *P. superbis*. Este resultado é consistente com a hipótese de proteção necessária contra o dano oxidativo causado pela perda de água. Estes efeitos deletérios provavelmente resultam do ataque por radicais aos componentes celulares, causando a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e mutações no DNA, o que pode alterar todo o metabolismo celular, eventualmente culminando na morte das células (Hansen *et al.*, 2006).

A diminuição na viabilidade (66%, comparado com o grupo controle) revela que se trata de um gene relativamente importante no processo. No entanto, apesar da importância atribuída a agentes antioxidantes na anidrobiose, a complexidade deste fenômeno provavelmente sugere o envolvimento de muitos outros mecanismos, como a acumulação de dissacáridos não-redutores, proteínas LEA, as proteínas de choque térmico, entre outros, que atuam em combinação quando a proteção é necessária.

Apesar da ausência de efeitos deletérios nos vermes silenciados em condições normais de umidade, vermes silenciados para GP41 são mais suscetíveis ao estresse oxidativo (exposição ao H₂O₂), revelada por uma redução da viabilidade. Estes resultados, portanto, confirmam que a peroxiredoxina está envolvida na proteção contra radicais livres e suportam a hipótese de que esta é importante na anidrobiose devido à sua atividade anti-oxidante (Arthur, 2000).

5.3 A gestão inovadora de recursos hídricos e a engenharia anidrobiótica: uma nova revolução na agricultura

A história humana registrou grandes marcos no uso da terra como fonte de recursos. O primeiro grande salto foi a *Revolução Agrícola* ocorrida no neolítico, marcada pela substituição dos hábitos nômades de caça e coleta para o estabelecimento de populações fixas e desenvolvimento de técnicas de agricultura.

Um segundo grande momento foi a *Revolução Verde* ocorrida durante as décadas de 1960 e 70, marcada pela mecanização, uso intensivo de insumos

industriais e melhoramento genético. Estas estratégias combinadas promoveram um aumento sem igual na produção agrícola mundial.

Uma terceira fase, a *Revolução Transgênica*, com início no final do século XX, registra a transição para o uso de sementes geneticamente modificadas portando características de interesse: resistência a herbicidas e patógenos, mais produtivas, com maior conteúdo nutricional, etc.

Nossa proposta visa uma gestão inovadora dos recursos hídricos na agricultura durante a seca através de uma estratégia sem precedentes: a anidrobiose. Objetivamos identificar as bases moleculares da anidrobiose, conhecer os fundamentos deste processo de resistência à dessecação extrema de tal forma que possamos aplicá-lo na produção agrícola.

Conseguimos **identificar e validar de maneira funcional** 35 genes associados à animação suspensa no verme *P. superbus*, algo sem precedentes na comunidade científica. Nenhum grupo de pesquisa no mundo realizou uma triagem funcional sobre a anidrobiose tão ampla quanto a descrita neste trabalho.

Esta primeira etapa é fundamental para o passo seguinte: a aplicação deste conhecimento para o desenvolvimento de estratégias de preservação de lavouras baseadas em anidrobiose, seja por transgênese ou pulverização.

Vislumbramos um novo cenário na agricultura mundial, na qual a seca não será mais um desafio intransponível e avassalador, mas simplesmente um evento temporário e não letal.

Como plantações protegidas por estratégias de anidrobiose estariam associadas a uma gestão inovadora de recursos hídricos? Nossa estratégia é exatamente administrar este recurso tão precioso – a água – quando ela for mais necessária: durante as secas.

Em períodos de estiagem, não apenas o solo (e as plantações) perdem água, mas também os próprios grandes reservatórios hídricos e barragens. Isto se torna um problema extremamente sério e complexo, pois estas águas armazenadas devem suprir a produção de energia (hidrelétricas), as demandas urbanas (consumo humano – hidratação e higiene), pecuárias (consumo do gado e produção animal) assim como a agricultura (evitar a perda da lavoura). Portanto, a gestão das águas em condições de seca gera paradoxos e situações extremamente conflitantes.

Propomos neste trabalho uma gestão inteligente e inovadora dos recursos hídricos aplicados ao solo em períodos de seca, que seriam **redirecionados**, *i.e.*,

preferencialmente investidos no consumo humano, animal e energético. Não haveria a necessidade de se utilizar volumes incalculáveis de água para irrigar as grandes extensões de terra em uso agrícola, uma vez que estas plantas poderiam ser reversivelmente preservadas a seco pelo processo de anidrobiose.

É importante lembrar que este estado de animação suspensa é estável por longos períodos (anos e décadas; Tunnacliffe e Lapinski, 2003), não havendo o risco das plantações se perderem por falta de água. Adicionalmente, a própria natureza - *i.e.* a chuva – se encarrega de reverter o quadro, promovendo a reidratação das plantas e trazendo-as de volta a vida sem nenhum dano estrutural ou fisiológico e sem acúmulo de compostos químicos no solo. Uma vez que os compostos de vitrificação são naturais, não há impacto ambiental algum - trata-se de um processo que ocorre na natureza a milhões de anos.

Por fim, esta gestão inovadora das águas aplicada ao uso do solo traz um ganho de acordo com a extensão em que a estratégia for utilizada. A engenharia anidrobiótica poderia ser usada apenas por um pequeno setor da lavoura de um pequeno agricultor, em apenas algumas regiões agrícolas, em estados inteiros ou utilizada mundialmente. Trata-se de uma abordagem nova, revolucionária, promissora, de origem natural, reversível, protetora e que permitirá um uso ainda mais inteligente das águas durante os desafios do tempo e do clima. Quanto maior for sua utilização, maior será a economia de água, a qual poderá ser aproveitada de uma maneira ainda melhor.

6. CONCLUSÕES

Aqui demonstramos pela primeira vez que a RNAi pode ser desencadeada de forma eficaz em *P. superbus* por imersão em soluções de dsRNA ou de RNA com 27 pb por 24 horas. Estas novas abordagens foram utilizadas com sucesso para a análise de ~100 genes potencialmente envolvidos com a tolerância à dessecação. Nossos resultados revelaram que 35 deles são relacionados com o processo, sendo muitos destas quinases, evidenciando um papel importante da sinalização celular/ativação de proteínas durante anidrobiose.

Também demonstramos que a peroxiredoxina está envolvida com a anidrobiose nesta espécie e que combate o estresse oxidativo, fornecendo um papel funcional para ela durante a dessecação nos vermes.

Propomos neste ensaio a utilização do conhecimento aqui gerado (genes associados à anidrobiose) para o desenvolvimento da engenharia anidrobiótica em plantas, preservando-as em períodos de estiagem. Esta estratégia permitiria uma gestão inteligente e inovadora dos recursos hídricos em períodos de seca, que seriam **redirecionados** para o consumo humano, animal e produção de energia.

7. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil (Processo 2008/54236-7) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil (Processo 472427/2008-3). Cláudia Carolina Silva Evangelista é beneficiária de uma bolsa de estudo da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); Tiago Campos Pereira foi beneficiário de uma bolsa da FAPESP (Processos 2009/01520-2). Agradecemos também a Gustavo Borges e Thais Fenz Araújo (Dpto de Biologia, FFCLRP, USP), Prof. Dr. Alan Tunnacliffe (Universidade de Cambridge), Profa. Dra. Ann Burnell (Universidade do Nacional da Irlanda) pelo auxílio técnico e discussões. Por fim, agradecemos a Deus pela realização deste ensaio.

8. REFERÊNCIAS

Reportagens na mídia

Pior seca dos últimos 50 anos no nordeste brasileiro confirma estatísticas da ONU sobre escassez, 08/04/2013 (acesso em 28 de agosto de 2013). Disponível em : <http://www.onu.org.br/pior-seca-dos-ultimos-50-anos-no-nordeste-brasileiro-confirma-estatisticas-da-onu-sobre-escassez/>

Dilma anuncia novo pacote de medidas para combater seca no Nordeste, 02/04/2013 (acesso em 28 de agosto de 2013). <http://www1.folha.uol.com.br/poder/1255973-dilma-anuncia-novo-pacote-de-medidas-para-combater-seca-no-nordeste.shtml>

Pior seca em 50 anos fecha empregos e arruína lucros no Nordeste, 05/05/2013 (acesso em 28 de agosto de 2013) <http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2013/05/1273540-pior-seca-em-50-anos-fecha-empregos-e-arruina-lucros-no-nordeste.shtml>

Literatura científica

Adhikari BN, Wall DH, Adams BJ. Desiccation survival in an Antarctic nematode: molecular analysis using expressed sequenced tags. *BMC Genomics*. 2009; 10:69.

Alcock R, Cottingham MG, Rollier CS, Furze J, De Costa SD, Hanlon M, Spencer AJ, Honeycutt JD, Wyllie DH, Gilbert SC, Bregu M, Hill AV. Long-term thermostabilization of live poxviral and adenoviral

vaccine vectors at supraphysiological temperatures in carbohydrate glass. *Sci Transl Med.* 2010;2(19):19ra12.

Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci.* 2000 57(13-14):1825-35.

Becquerel, P. 1950a. La suspension de la vie audessous de 1/20°K absolu par demagnétisation adiabatique de l'alun de fer dans le vide le plus élevé. *Compt. Rend. Acad. Sci., Paris.* 231:261.

Becquerel, P. 1950b. La suspension de la vie des spores des bactéries et de moisissures desséchées dans le vide vers le zero absolu. Leurs conséquences pour la dissemination et la conservation de la vie dans l'univers. *Compt. Rend. Acad. Sci., Paris.* 231:1392.

Boschetti C, Carr A, Crisp A, Eyres I, Wang-Koh Y, Lubzens E, Barraclough TG, Micklem G, Tunnacliffe A. Biochemical diversification through foreign gene expression in bdelloid rotifers. *PLoS Genet.* 2012;8(11):e1003035.

Browne J, Tunnacliffe A, Burnell A. Anhydrobiosis: plant desiccation gene found in a nematode. *Nature.* 2002 Mar 7;416(6876):38.

Campbell EM, Ball A, Hoppler S, Bowman AS. Invertebrate aquaporins: a review. *J Comp Physiol B.* 2008 Nov;178(8):935-55.

Cornette R, Kikawada T. The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: current status of our knowledge. *IUBMB Life.* 2011 Jun;63(6):419-29.

Crowe, JH. Anhydrobiosis: An Unsolved Problem. *The American Naturalist*, 1971. Vol. 105, No. 946.
Eyres I, Frangedakis E, Fontaneto D, Herniou EA, Boschetti C, Carr A, Micklem G, Tunnacliffe A, Barraclough TG. Multiple functionally divergent and conserved copies of alpha tubulin in bdelloid rotifers. *BMC Evol Biol.* 2012 Aug 17;12:148.

Feinberg EH, Hunter CP. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science.* 301(5639):1545-7.

França MB, Panek AD, Eleutherio EC. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007 146(4):621-31.

Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature.* 2006;441(7092):537-41.

Groll M, Potts BC. Proteasome structure, function, and lessons learned from beta-lactone inhibitors. *Curr Top Med Chem.* 2011 Dec;11(23):2850-78.

Haegeman A, Jacob J, Vanholme B, Kyndt T, Mitreva M, Gheysen G. Expressed sequence tags of the peanut pod nematode *Ditylenchus africanus*: the first transcriptome analysis of an Anguinid nematode. *Mol Biochem Parasitol.* 2009 Sep;167(1):32-40.

Hansen JM, Go YM, Jones DP. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:215-34.

Heyninck K, Beyaert R. A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci.* 2005 Jan;30(1):1-4.

Hishiya A, Iemura S, Natsume T, Takayama S, Ikeda K, Watanabe K. A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *EMBO J.* 2006 Feb 8;25(3):554-64.

Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(8):1757-66.

- Issa Z, Grant WN, Stasiuk S, Shoemaker CB. Development of methods for RNA interference in the sheep gastrointestinal parasite, *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol*. 2005 Aug;35(9):935-40.
- Jin Y, Penning TM. Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:263-92.
- Keilin, D. 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*, 1959. Vol. 150, No.939.
- Larsen PL. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 90(19):8905-9.
- Mali B, Grohme MA, Förster F, Dandekar T, Schnölzer M, Reuter D, Welnicz W, Schill RO, Frohme M. Transcriptome survey of the anhydrobiotic tardigrade *Milnesium tardigradum* in comparison with *Hypsibius dujardini* and *Richtersius coronifer*. *BMC Genomics*. 2010; 11:168.
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1994 17(3):235-48.
- Mindnich RD, Penning TM. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Hum Genomics*. 2009 Jul;3(4):362-70.
- Pereira TC, Pascoal VDB, Secolin R, Rocha CS, Maia IG and Lopes-Cendes I. Strand Analysis, a free online program for the computational identification of the best RNA interference (RNAi) targets based on Gibbs free energy. *Genetics and Molecular Biology*, 2007; 30 (4): 1206-1208.
- Picken NC, Eschenlauer S, Taylor P, Page AP, Walkinshaw MD. Structural and biological characterisation of the gut-associated cyclophilin B isoforms from *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol*. 2002 Sep 6;322(1):15-25.
- Reardon W, Chakrabortee S, Pereira TC, Tyson T, Banton MC, Dolan KM, Culleton BA, Wise MJ, Burnell AM, Tunnacliffe A. Expression profiling and cross-species RNA interference (RNAi) of desiccation-induced transcripts in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *BMC Mol Biol*. 2010 Jan 19;11:6. doi: 10.1186/1471-2199-11-6.
- Sakurai M, Furuki T, Akao K, Tanaka D, Nakahara Y, Kikawada T, Watanabe M, Okuda T. Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1;105(13):5093-8.
- Schokraie E, Hotz-Wagenblatt A, Warnken U, Mali B, Frohme M, Förster F, Dandekar T, Hengherr S, Schill RO, Schnölzer M. Proteomic analysis of tardigrades: towards a better understanding of molecular mechanisms by anhydrobiotic organisms. *PLoS One*. 2010 Mar 3;5(3):e9502.
- Schokraie E, Warnken U, Hotz-Wagenblatt A, Grohme MA, Hengherr S, Förster F, Schill RO, Frohme M, Dandekar T, Schnölzer M. Comparative proteome analysis of *Milnesium tardigradum* in early embryonic state versus adults in active and anhydrobiotic state. *PLoS One*. 2012;7(9):e45682.
- Seki K e Toyoshima M. Preserving tardigrades under pressure. *Nature* 1998, 395:853-854
- Shannon AJ, Browne JA, Boyd J, Fitzpatrick DA, Burnell AM. The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics of species and strains of *Panagrolaimus* (Nematoda, Panagrolaimidae). *J Exp Biol*. 2005;208(Pt 12):2433-45.
- Shih JD, Fitzgerald MC, Sutherland M, Hunter CP. The SID-1 double-stranded RNA transporter is not selective for dsRNA length. *RNA*. 2009 Mar;15(3):384-90.
- Sies H (2000). What is oxidative stress?. (ed. J. F. Keaney). *Oxidative Stress and Vascular Disease*. Kluwer Academic Publishers Boston, MA. 1-8.

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*. 2003 Oct 29;358(1438):1755-71.

Tyson T, O'Mahony Zamora G, Wong S, Skelton M, Daly B, Jones JT, Mulvihill ED, Elsworth B, Phillips M, Blaxter M, Burnell AM. A molecular analysis of desiccation tolerance mechanisms in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus* using expressed sequenced tags. *BMC Res Notes*. 2012; 5:68.

Vij S, Tyagi AK. A20/AN1 zinc-finger domain-containing proteins in plants and animals represent common elements in stress response. *Funct Integr Genomics*. 2008 Aug;8(3):301-7. doi: 10.1007/s10142-008-0078-7. Epub 2008 Mar 5.

Watanabe M, Sakashita T, Fujita A, Kikawada T, Horikawa DD, 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. *Int J Radiat Biol*. (8):587-92. (FIGURA)

Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*. 2004 Aug 5;430(7000):694-9.

Yamaguchi A, Tanaka S, Yamaguchi S, Kuwahara H, Takamura C, Imajoh-Ohmi S, Horikawa DD, Toyoda A, Katayama T, Arakawa K, Fujiyama A, Kubo T, Kunieda T. Two novel heat-soluble protein families abundantly expressed in an anhydrobiotic tardigrade. *PLoS One*. 2012;7(8):e44209.

Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(9):6047-52.

Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbeck D, Petranovic M, Lindner AB, Radman M. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature*. 2006 Oct 5;443(7111):569-73.

9. ANEXOS

ANEXO 1.

Tabela 1. Lista dos genes selecionados para triagem. Legenda: *: genes com pequena redução na viabilidade após silenciamento sem dessecação. Sublinhado: silenciamento gênico aumentou a porcentagem de sobrevivência após dessecação (apenas 1 alvo). Em cinza: 35 alvos cujo silenciamento diminuiu a porcentagem de sobrevivência após dessecação. Em itálico: controles positivos.

Tabela retirada devido a exigência para publicação em revistas internacionais indexadas