

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

“Efeitos biológicos e bioquímicos do óxido de deutério e seu possível impacto na anidrobiose”

Gabriel José De Carli

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.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

RIBEIRÃO PRETO, SP
2015

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

“Efeitos biológicos e bioquímicos do óxido de deutério e seu possível impacto na anidrobiose”

Gabriel José De Carli

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.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

RIBEIRÃO PRETO, SP
2015

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.

De Carli, Gabriel José, 1993 –

Efeitos biológicos e bioquímicos do óxido de deutério e seu possível impacto na anidrobiose

Gabriel José De Carli. Ribeirão Preto: USP, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Universidade de São Paulo, Curso de Ciências Biológicas, 2015.

1. Anidrobiose. 2. Óxido de Deutério. 3. SIE. 4. *Panagrolaimus superbus*. I. Pereira, Tiago Campos. II. Universidade de São Paulo. Curso de Ciências Biológicas. III. Título.

PARECER

O trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas que se intitula **“Efeitos biológicos e bioquímicos do óxido de deutério e seu possível impacto na anidrobiose”**

O aluno Gabriel José De Carli obteve a nota 9,7 com distinção e louvor.

Ribeirão Preto, 07 de Dezembro de 2015.

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

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

Dr^a. Erna Hérica Domingues de Oliveira
Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
(Membro Titular)

Prof Dr. João Atílio Jorge
Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
(Membro Suplente)

M.Sc. Vitor Leão
Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
(Membro Suplente)

Primeiramente agradeço aos meus pais, que abriram mão de muita coisa e trabalharam a vida inteira para me dar a oportunidade de ter um curso superior. Anastácio e Clair De Carli, agradeço-vos da maneira mais sincera que posso.

Agradeço também ao Laboratório de Genética Molecular da Anidrobiose, todas as pessoas que passaram por lá, as que se foram: Fernanda, Lorena e Cláudia, e os que ainda estão lá: Tiago Alves. Tenho muito que dizer ‘obrigado’ ao meu orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira por ter me ensinado, senão tudo, quase tudo o que sei sobre Biologia Molecular, Anidrobiose, microRNAs e como se fazer ciência na prática. Tenho que agradecer também pela paciência e por ter acreditado em mim durante esses longos três anos.

Agradeço a USP, especialmente a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (FFCLRP), ao departamento de biologia e aos órgãos de fomento, Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela infraestrutura e apoio econômico.

Obrigado turma 49 de biologia da filô, pela longa companhia de quatro anos, sendo que mais estão por vir. Em especial aos meus amigos Laura, Aline, Danilo e João Pedro por terem me suportado nesse tempo e por ter que me aguentar por mais um tempo.

Por último, mas não menos importante, ao pessoal que mora comigo, que apesar da correria com a mudança recente e ter que reformar apartamento me deu o tempo necessário para me focar nesse trabalho e fazê-lo com total dedicação.

*“Se enxerguei mais longe,
foi porque me apoiei nos ombros de gigantes”.*

(Isaac Newton)

Efeitos biológicos e bioquímicos do óxido de deutério e seu possível impacto na anidrobiose

A anidrobiose é um estado de alta estabilidade no qual algumas espécies adentram quando enfrentam forte estresse hídrico do ambiente. Estes organismos se mantêm viáveis, retornando à vida quando reidratados. O conhecimento detalhado deste fenômeno, bem como de suas características, pode fornecer meios para aumentar a tolerância de estruturas biológicas ao a estresse hídrico. A partir deste conhecimento seria possível, a princípio, desenvolver tecnologias na área médica para o armazenamento e transporte de órgãos, vacinas, enzimas de interesse e outras aplicações a longo prazo, de maneira mais barata em relação a criogenia. Ou ainda na produção de alimentos, com linhagens de plantas mais resistentes a seca. Em anidrobiose os organismos se tornam tolerantes a diversos fatores físicos, como extremos de temperatura, radiação ionizante, elevadas pressões hidrostáticas, entre outros. Nesse contexto, este trabalho busca avaliar se o estado anidrobiótico confere alguma tolerância ao óxido de deutério (água deuterada), formada por um átomo de oxigênio e dois de deutério (isótopo natural e estável do hidrogênio, com um nêutron adicional no núcleo atômico). A água deuterada, em altas concentrações, é descrita na literatura como causadora de efeitos negativos para organismos. Em contrapartida, em concentrações adequadas pode ter utilidade médica e farmacológica, por exemplo, no tratamento de câncer. Este trabalho, investiga os efeitos causados pela água deuterada (D₂O) no nematoide anidrobiótico *Panagrolaimus superbis* (imersão por 24 h ou reidratação após dessecação), bem como alterações em processos importantes como duplicação do DNA e a transcrição gênica. Os resultados encontrados demonstram que concentrações de 45% de D₂O ou superiores diminuem a eficiência da replicação e da transcrição gênica *in vitro*, mas não alteram a atividade da DNase I. Além disso, o *P. superbis* não demonstrou queda da viabilidade quando exposto em concentrações de 99,9% D₂O independentemente de ter sido dessecado.

Palavras chave: Anidrobiose, óxido de deutério, água deuterada, SIE, tolerância a dessecação, *Panagrolaimus superbis*

Biological and biochemical effects by deuterium oxide and the possible impact on anhydrobiosis

Anhydrobiosis is a highly stable state in which certain species can enter when exposed to extreme water stress. These anhydrobiotic organisms remain viable, resuming life when rehydrated. The detailed understanding of this phenomenon, as well as of its characteristics, may provide ways to improve the tolerance of biological structures to water loss. From this knowledge it would be possible, in principle, to develop medical technologies for long-term preservation and transportation of organs, vaccines, enzymes of interest, etc, in a cheaper way than cryogenic methods. Or in food production, with drought-tolerant plant cultivars. Anhydrobiosis renders the organism very resistant to various physical factors, such as extremes of temperature, ionizing radiation, hydrostatic pressure, among others. In this context, this work aims to investigate whether anhydrobiosis confers any resistance to deuterium oxide (or deuterated water), which is formed by one atom of oxygen and two atoms of deuterium (a stable and natural isotope of hydrogen with one additional neutron in the atomic nucleus). Deuterium water is reported on literature as causing negative effects to organisms in high concentrations. In contrast, in certain concentrations, it may have medical and pharmacological utilities, for example, in cancer treatment. The present work investigates the effects of deuterium oxide (D₂O) in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus* (soaking for 24 h or rehydration after desiccation), as well as its impact on important cellular processes such as DNA duplication and gene transcription. The finding data show that in concentrations of 45% D₂O or higher decreases the efficiency of *in vitro* DNA replication and gene transcription, but the DNase I activity was not changed. Furthermore, *P. superbus* didn't demonstrate any decrease of viability in 99,9% D₂O, independently of been desiccated.

Keywords: Anhydrobiosis, deuterium oxide, deuterated water, SIE, desiccation tolerance, *Panagrolaimus superbus*

- ~: Aproximadamente
- ≤: Menor ou igual a
- μL: Microlitro
- μm: Micrômetro
- μM: Micromolar
- μN: Micronewton
- ^{12}C : Carbono (elemento)
- ^1D : Deutério (isótopo)
- ^1T : Trítio (isótopo)
- ^2H : Deutério (isótopo)
- 3': Extremidade de um nucleotídeo com carbono 3 livre, sem ligação fosfodiéster
- ^3H : Trítio (isótopo)
- ^3He : Isótopo leve do elemento Hélio
- ^4He : Isótopo pesado do elemento Hélio
- 5': Extremidade de um nucleotídeo com fosfato do carbono 5 não ligado a outro nucleotídeo
- ^7Li : Isótopo estável pesado do elemento Lítio
- A: Adenina
- C: Citosina
- cal: Caloria
- cDNA: DNA complementar
- cm: Centímetro
- conc.: Concentração
- d: Quark Down
- D_2O : Óxido de deutério, água deuterada ou água pesada
- DIE (*Deuterium Isotopic Effect*): Efeito isotópico do deutério
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- dNTP: Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
- dyn: Dina (unidade de força, = 10^{-5} Newton)

- e.g. (do Latin, *exempli gratia*): por exemplo
- E_0 : Energia livre de Gibbs inicial
- E_0^D : Energia livre de Gibbs inicial do deutério
- E_0^H : Energia livre de Gibbs inicial do hidrogênio
- epPCR (*error-prone Polymerase Chain Reaction*): Reação em cadeia da polimerase propensa a erros
- et al. (Latin): e colaboradores
- g/g: Proporção massa por massa (em gramas)
- g: Aceleração da gravidade (9,8 metros por segundo ao quadrado)
- g: Grama (unidade de massa)
- G: Guanina
- GFP (*Green Fluorescent Protein*): proteína verde fluorescente
- h : Constante de Planck
- H: Hidrogênio (elemento)
- h: hora
- H_2O : Água
- HTO: Água semi-tritiada, água semi-superpesada
- i.e. (Latin, *id est*): isto é
- ICRP: Comissão Internacional de Proteção Radiológica
- IVT (*in vitro transcription*): Transcrição *in vitro*.
- J: Joule
- K: Potássio (elemento)
- KIE (*Kinect Isotopic Effect*): Efeito isotópico cinético
- L1: Larvas no 1º estágio de desenvolvimento
- L2: Larvas no 2º estágio de desenvolvimento
- L4: Larvas no 4º estágio de desenvolvimento
- LEA (*Late Embryogenic Abundant*): Proteína abundante no final da embriogênese de sementes
- m/v: Proporção massa/volume
- M: Molar

- M9: Tampão (isomótico para *P. superbis*)
- mA: Milliampere
- Mg: Magnésio (Elemento)
- MgCl₂: Cloreto de magnésio
- mL: Mililitro
- mM: Milimolar
- Mn: Manganês (elemento)
- Mn²⁺: Cátion bivalente de Manganês
- mol: grandeza de quantidade de substância (=6,022 x 10²³)
- mRNA: RNA mensageiro
- n: Nêutron
- Na: Sódio (elemento)
- NaClO: Hipoclorito de sódio
- NaOH: Hidróxido de sódio
- ng: Nanograma
- NGM (*Nematode Growth Medium*): Meio de cultura para nematoides
- NTP: Nucleosídeos trifosfatados
- OBT (*Organic Bound Tritium*): Compostos orgânicos com trítio ligado
- p: Próton
- p: Valor-p ou Nível descritivo (estatística)
- Pa: Pascal, unidade de pressão (=1 Newton/metro ao quadrado)
- pb: Par(es) de base(s)
- PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reação em cadeia da DNA polimerase
- pH: Potencial hidrogeniônico
- ppm: Partes por milhão
- RBE (*Relative Biological Effectiveness*): Eficácia biológica relativa
- RH: Umidade relativa
- RT-qPCR (*Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction*): transcrição reversa seguida pela reação em cadeia e quantitativa da DNA polimerase.

- s: segundo (unidade de tempo).
- SIE (*Solvent Isotopic Effect*): Efeito isotópico de solvente
- T: Timina
- T₂O: Água tritiada, água superpesada
- Temp.: Temperatura
- TM (*trademark*): Marca registrada
- u: Quark Up
- U: Unidade de atividade enzimática
- v/v: Proporção volume por volume
- ν : Frequência dos átomos envolvidos na ligação
- V: Volt
- β : letra grega beta

Figura 1. Representantes de espécies anidrobióticas são observados em todos os reinos.....	03
Figura 2. Níveis de hidratação e a anidrobiose.....	06
Figura 3. Espécies do filo <i>Nematoda</i>	10
Figura 4. Modelos atômicos revelando as diferenças entre o hidrogênio e seus isótopos.....	13
Figura 5. Diferença entre os valores de energia livre de Gibbs (E_0) entre os reagentes hidrogenados (E_0^H) e deuterados (E_0^D).....	16
Figura 6. Média do tempo de sobrevivência de camundongos em função da concentração de D_2O diluído na água fornecida.....	19
Figura 7. Influência da D_2O nos níveis de expressão gênica.....	21
Figura 8. Micrografia da coloração de vermes após a reidratação para cálculo da viabilidade.....	30
Figura 9. Fluxograma com os procedimentos gerais das reações bioquímicas em óxido de deutério.....	33
Figura 10. Fluxograma com os procedimentos gerais referentes aos ensaios <i>in vivo</i> com óxido de deutério.....	34
Figura 11. Efeitos do óxido de deutério na duplicação do DNA (PCR).....	36
Figura 12. Efeitos do óxido de deutério na transcrição <i>in vitro</i>	37
Figura 13. Eletroforese das reações de digestão por DNase I.....	38
Figura 14. Viabilidade de larvas L2 dessecadas e reidratadas com diferentes concentrações de D_2O	39
Figura 15 Viabilidade de larvas L2 imersas por 24h em H_2O/D_2O	40
Figura 16. Efeito do D_2O na viabilidade pós-reidratação versus pós-imersão.....	41

1. Introdução.....	01
1.1 A anidrobiose.....	02
1.2 Modelo de Estudo.....	09
1.3 Óxido de Deutério.....	11
2. Objetivos.....	22
2.1 Gerais.....	23
2.2. Específicos.....	23
3. Materiais e Métodos.....	24
3.1 Reações bioquímicas do óxido de deutério.....	25
3.1.1 Duplicação do DNA: PCR com D ₂ O.....	25
3.1.2 Reação de transcrição <i>in vitro</i> (IVT) com D ₂ O.....	26
3.1.3 Reação de digestão com DNase I.....	27
3.2 Eletroforese e densitometria.....	27
3.3 Manutenção de <i>P. superbus</i>	28
3.4 Obtenção de uma população homogênea de larvas L2.....	28
3.5 Desafio de dessecação das larvas L2.....	29
3.6 Determinação da viabilidade.....	30
3.7 Viabilidade de vermes imersos em H ₂ O/D ₂ O por 24h.....	31
3.8 Análise dos dados.....	31
4. Resultados.....	35
4.1 Efeitos do D ₂ O em reações bioquímicas.....	36
4.1.1 Duplicação do DNA (PCR).....	36
4.1.2 Transcrição <i>in vitro</i>	37
4.1.3 Digestão com DNase I.....	38
4.2 Efeitos na viabilidade de <i>P. superbus</i>	39
4.2.1 Larvas L2 desseccadas e reidratadas com H ₂ O/D ₂ O.....	39
4.2.2 Larvas L2 (não desseccadas imersas por 24h em H ₂ O/D ₂ O.....	40
4.2.3 Comparação entre larvas L2 desseccadas-reidratadas com H ₂ O/D ₂ O versus larvas L2 imersas por 24h em H ₂ O/D ₂ O.....	41
5. Discussão.....	42
5.1 Efeitos do óxido de deutério na replicação, transcrição e digestão com DNase I.....	43
5.2 Efeitos do óxido de deutério na biologia de <i>P. superbus</i>	47
6. Apêndices.....	50
Apêndice A.....	51
Apêndice B.....	52
Apêndice C.....	52
Apêndice D.....	53
Apêndice E.....	53
Apêndice F.....	54
Apêndice G.....	55
7. Referências Bibliográficas.....	56

1. Introdução

1.1 Anidrobiose

O fenômeno da *anidrobiose*, termo derivado do grego "vida sem água", foi observado pela primeira vez por Antonie van Leeuwenhoek (1632 - 1723) (revisto em Tunnacliffe e Lapinski, 2003). Leeuwenhoek, ao adicionar água em amostras de pó presentes em calhas, que inicialmente não apresentavam sinais de vida observou, posteriormente, a presença do que ele chamava de 'animálculos'. A descrição feita por Leeuwenhoek é muito semelhante ao rotífero bdeloide *Philodina roseola* (Figura 1D) (Tunnacliffe e Lapinski, 2003).

Estudos subsequentes evidenciaram que existiam espécies representantes de todos os reinos biológicos com a capacidade de sobreviver à dessecação extrema (Figura 1): Reino *Monera* (*Deinococcus radiodurans*) (Mattimore e Battista, 1996), *Protista* (*Colpoda inflata*) (Müller *et al.*, 2010), *Fungi* (*Saccharomyces cerevisiae*) (Schebor *et al.*, 2000), *Animalia* (*Philodina Roseola*) (Ford, 1981) e *Plantae* (*Selaginella lepidophylla*) (Oliver *et al.*, 2000). Adicionalmente, estas espécies podem ser divididas em duas categorias, de acordo com o estágio do desenvolvimento capaz de tolerância à dessecação extrema: anidrobióticos estágio-específico, ou holo-anidrobióticos (Jönsson, 2005).

O primeiro grupo engloba organismos capazes de entrar em anidrobiose em apenas um estágio do desenvolvimento ou na forma de propágulo, por exemplo: a *larva* do díptero *Polypedilum vanderplanki* (Hinton, 1960; Watanabe, 2006), *esporos* de alguns fungos e bactérias (Sussman e Halvorson, 1966), além de *sementes* e *grãos de pólen* de algumas plantas (Vegis, 1964). Enquanto o segundo grupo representa aqueles capazes de adentrar no estado anidrobiótico em qualquer fase do seu ciclo de vida, sendo representados por tardígrados, rotíferos e nematoides (Marcus, 1929; Schmidt, 1948; Ramazzotti, 1962; Van Gundy, 1965; Cooper e Van Gundy, 1971; Crowe, 1971).

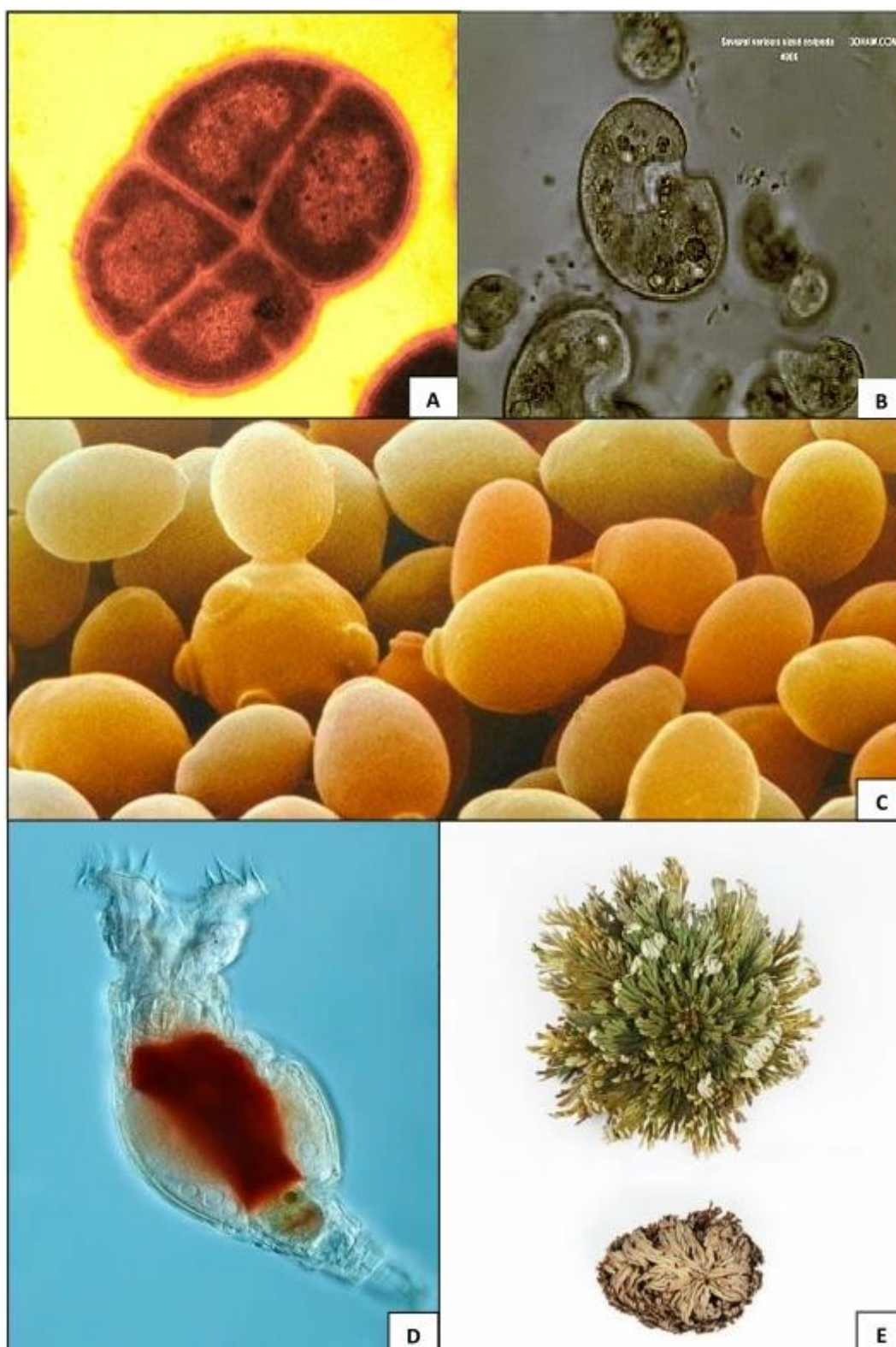


Figura 1. Representantes de espécies anidrobióticas são observados em todos os reinos. (A) A bactéria *Deinococcus radiodurans* (Monera), (B) o ciliado *Colpoda inflata* (Protista), (C) a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fungi), (D) o rotífero bdloide *Philodina roseola* (Animalia) e (E) a planta da ressurreição *Selaginella lepidophylla* (Plantae) (Imagens retiradas da internet).

O valor da molécula de água para vida como ela é conhecida parece óbvio, mas frequentemente seu papel é subestimado em textos acadêmicos (Chaplin, 2001). Sua estrutura, formando um dipolo, permite solubilizar diversos compostos biológicos de extrema importância, como proteínas e ácidos nucleicos. Esta hidratação é de crucial relevância para a atividade biológica destes compostos, sendo que para as proteínas assumirem sua conformação tridimensional (e conseqüentemente sua forma ativa), uma concha de hidratação é necessária. O mesmo raciocínio pode ser feito para o DNA, que requer cerca de 30%, da sua massa, em água para manter sua conformação (Chaplin, 2001). Diante disso, é surpreendente o fato de que espécies possam se manter viáveis, por décadas, mesmo com quantidades de água muito abaixo do necessário para o metabolismo (Steiner e Albin, 1946; Guidetti e Jönsson, 2002).

Para Keilin (1959), a anidrobiose constitui uma forma particular de criptobiose (do grego "vida escondida"). Este termo foi proposto por ele e descreve um estado de *vida latente*, no qual o organismo não possui uma taxa metabólica, ou o metabolismo não é significativo para mostrar sinais de vida; ou seja, seu metabolismo é considerado paralisado ou não pode ser mensurado. A criptobiose é dividida em categorias, de acordo com a causa que a induz: a *criobiose* (criptobiose induzida por baixas temperaturas), *termobiose* (por temperaturas elevadas), *osmobiose* (por osmolaridade extrema), *anoxibiose* (pela falta de oxigênio) e já mencionado anteriormente, *anidrobiose* (pela dessecação extrema) (Keilin, 1959). Esta última é o foco deste trabalho

Neste contexto, o pesquisador James Clegg propôs um terceiro estado de organização biológica além do vivo e do morto, o criptobiótico, uma vez que neste estado a *total suspensão do metabolismo é reversível* (Clegg, 2001).

Alfred Giard (1894) propôs o termo "anidrobiose" para descrever o estado de animação suspensa (criptobiose) no qual um organismo ingressa pela dessecação extrema. O termo já está bem fixado na literatura, sendo que a tradução literal do grego "vida sem água" é considerada tecnicamente incorreta, porque o organismo neste estado não é considerado vivo e sempre há uma pequena parcela de água remanescente, insuficiente para manter as taxas metabólicas (Tunnacliffe e Lapinski, 2003).

Neste estado de animação suspensa o organismo adquire tolerância a diversos estresses. Há relatos de que organismos dessecados que, mesmo sendo expostos a altas doses de radiação X e ultravioleta, pressões hidrostáticas elevadas (600 MPa), extremos de temperatura (~ -273 °C e $+151$ °C), se mantiveram viáveis, voltando à vida após a reidratação (Doyère, 1842; Rahm, 1923, 1937; Becquerel, 1950; Keilin, 1959; Seki e Toyoshima, 1998; Tunnacliffe e Lapinski, 2003).

Além da estabilidade a fatores físicos extremos (geralmente por curtos períodos de tempo), há também relatos de viabilidade após longuíssimos períodos de tempo (em condições não extremas). Por exemplo, a (questionável) recuperação de bactérias halotolerantes de 250 milhões de anos (Vreeland, *et al.*, 2000) e de sementes de lótus com 1000 anos (Shen *et al.*, 1995). Os registros cientificamente comprovados e mais bem documentados se referem a tardígrados, rotíferos e nematoides que se mantiveram viáveis por período da ordem de décadas (Steiner e Albin, 1946; Guidetti e Jönsson, 2002).

No processo de anidrobiose, podem ser caracterizadas três fases: desidratação, dessecação e a fase seca (figura 2). Durante a primeira fase, **a desidratação**, ocorre a perda progressiva de água, porém as macromoléculas permanecem totalmente hidratadas. A perda de água causa, dentro da célula, mudança nas concentrações dos solutos, no pH e aumento da viscosidade. Tais alterações podem desestabilizar polissacarídeos, proteínas

e ácidos nucleicos, pois interferem nas pontes (ou ligações) de hidrogênios e forças hidrofóbicas entre estas macromoléculas (Clegg, 1978; Stryer, 1999). A célula se encontra em um estado no qual as vias bioquímicas começam a falhar (Clegg, 1978; Wormersley, 1981). É nesta fase metabolicamente ativa que a célula anidrobiótica ativa as adaptações necessárias para sobreviver a este estresse hídrico, como acúmulo de proteínas hidrofílicas e dissacarídeos não-redutores (revisto em Tunnacliffe e Lapinski, 2003).

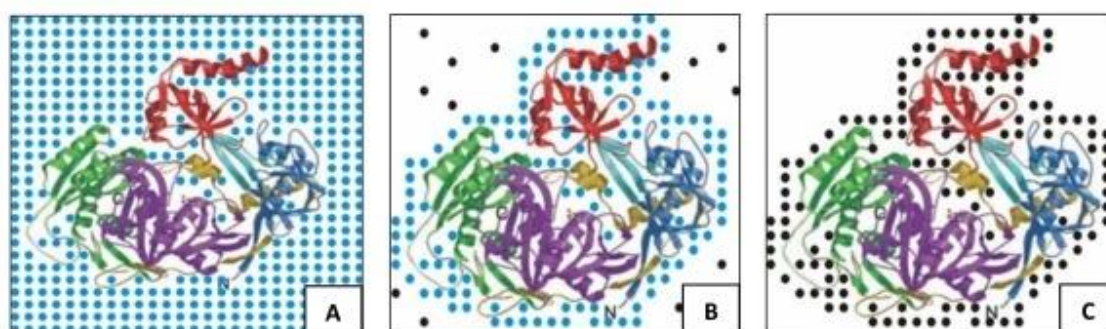


Figura 2. Níveis de hidratação e a anidrobiose. (A) Condição normal de hidratação de uma célula, os pontos azuis representam moléculas de água. (B) Na fase de desidratação, as macromoléculas permanecem hidratadas e há a síntese dos dissacarídeos não-redutores representados pelos pontos pretos. (C) A fase seca, na qual as macromoléculas são totalmente envolvidas por uma concha sólida, o biovidro, e ficam presas no tempo e no espaço (Burke, 1986) (Figura de Guidelli (2011), cujo original é adaptado de Song *et al.*, 2004).

Esses dissacarídeos não-redutores representados, principalmente, pela trealose e sacarose (utilizados por animais e vegetais, respectivamente) têm alta solubilidade e não são reativos, podendo ser acumulados em altas quantidades dentro da célula, contrabalanceando a alta osmolaridade extracelular nesta fase. Ademais, estes dissacarídeos agem como estabilizadores termodinâmicos dificultando, ou até mesmo impossibilitando, mudanças estruturais que seriam causadas pela desidratação.

Entretanto, a simples presença destes dissacarídeos não-redutores não confere a capacidade de tolerância à dessecação extrema. Por exemplo, mutantes *Abi-3* da planta modelo *Arabidopsis thaliana*, insensíveis ao ácido abscísico, mostraram acúmulos de

sacarose e outros mono-oligossacarídeos nas sementes. Mesmo com o acúmulo de sacarose, as sementes não foram capazes de suportar estresse hídrico extremo, mostrando que o simples acúmulo destes carboidratos não confere a capacidade de entrar em anidrobiose (Ooms et al., 1993). O mesmo resultado foi encontrado em células de ratos modificadas geneticamente com genes bacterianos para síntese de trealose: as células não entraram em anidrobiose apesar de sua tolerância a desidratação ter aumentado (Garcia de Castro e Tunnacliffe, 2000).

Outra evidência que permite concluir que estes dissacarídeos não são requisitos obrigatórios para a anidrobiose foi a descoberta de rotíferos anidrobióticos que não acumulam tais compostos (revisto em Lapinski e Tunnacliffe, 2003).

A segunda fase, a **dessecação**, é alcançada quando o conteúdo de água na célula atinge dimensões inferiores a 0,3 g/g de massa seca e, particularmente quando atingem 0,1 g/g de massa seca, o metabolismo para. Nesta condição a falta de água é tão grande que as macromoléculas não estão completamente hidratadas, o que pode levar a uma desestabilidade estrutural. Nesta fase é proposto que os dissacarídeos não-redutores (trealose e sacarose) atuem como moléculas de água, formando ligações de hidrogênio com as macromoléculas e, assim, evitando danos estruturais irreversíveis (Clegg, 1974, 1986; Crowe *et al.*, 1992; revisto em Tunnacliffe e Lapinski, 2003).

A próxima fase - o **estágio seco** - representa a anidrobiose propriamente dita. Nesta etapa, a matriz aquosa do citoplasma é substituída por uma matriz sólida e amorfa, o biovidro (do inglês "*bioglass*", Sakurai *et al.*, 2008) gerado pelo processo denominado vitrificação. É proposto que a trealose e a sacarose em altas concentrações são fundamentais para o processo de vitrificação, atuando como estabilizadores cinéticos e aumentando a viscosidade intracelular. Sendo uma matriz sólida, este biovidro impediria

qualquer difusão molecular, paralisando as reações bioquímicas na célula, portanto promovendo uma animação suspensa (revisto em Tunnacliffe e Lapinski, 2003).

Vale destacar que o processo de entrada em anidrobiose não é único para todas as espécies capazes de animação suspensa (revisto em Tunnacliffe e Lapinski, 2003). Isto demonstra a complexidade do fenômeno, sugerindo a existência de vias alternativas associadas à manutenção da integridade celular durante um estresse hídrico extremo. Outras adaptações potencialmente envolvidas incluem: acúmulo de proteínas hidrofílicas como as LEAs (*Late Embryogenesis Abundant*) reportadas em sementes de plantas, proteínas *heat shock*, modificações na membrana celular, alterações metabólicas, sistemas antioxidantes, entre outros (Reardon *et al.*, 2010).

O estudo do fenômeno da anidrobiose e de seus mecanismos bioquímicos é relevante para o desenvolvimento da engenharia anidrobiótica. Esta área busca transformar células, tecidos, órgãos - e futuramente até organismos inteiros - que naturalmente não são anidrobióticos, em tolerantes a dessecação extrema (Garcia de Castro *et al.*, 2000). A relevância da engenharia anidrobiótica é muito grande no desenvolvimento de métodos para preservação a seco de materiais biológicos sensíveis a desidratação na agricultura e na área médica (França *et al.*, 2007).

Na agricultura, futuras linhagens de plantas com tolerância a períodos de estiagem podem interferir diretamente na produção agrícola. Estas linhagens poderiam ser criadas por meio da introdução e/ou indução da expressão dos genes constituintes da via de anidrobiose. Isto permitiria a sobrevivência de culturas agrícolas durante as secas, assim como a estocagem de sementes e frutos a seco (França *et al.*, 2007).

Na área médica, futuras técnicas baseadas em anidrobiose teriam grande aplicabilidade no armazenamento de sêmen e sangue, transporte de órgãos e construção

de banco de células e tecidos, dentre outros. A possibilidade disso se dá pelas características e propriedades das células/estruturas no estado anidrobiótico. O armazenamento destes materiais a seco é menos custoso e pode ser feito por maior período de tempo do que o método de criogenia (revisto em Tunnacliffe e Lapinski, 2003).

Pode haver ainda, na área médica, uma aplicabilidade terapêutica. Wilson e Sherman (2010) infectaram populações do rotífero anidrobiótico *Habrotrocha elusa* com um fungo (*Rotiferophthora angustipora*), cuja proliferação leva ao colapso destas populações. Posteriormente, estas populações infectadas foram dessecadas por um período de quatro semanas e, após a reidratação, o rotífero, tolerante à dessecação extrema retornou à vida normalmente, enquanto o fungo (não anidrobiótico) não resistiu ao estresse. Portanto, a população do rotífero que iria colapsar por infecção, não sofreu o dano ao passar por um evento não invasivo, capaz de eliminar o patógeno.

1.2 Modelo de Estudo - *P. superbus*

Dentre as espécies anidrobióticas existentes está o *Panagrolaimus superbus*, modelo de estudo desta pesquisa (filo *Nematoda*, classe *Panagrolaimidae* e ordem *Rhabdita*) (De Ley e Blaxter, 2002). As espécies deste filo (figura 3) são encontrados em uma ampla diversidade de ambientes, desde solos profundos com maior proteção, até superfícies onde ocorre maior exposição ao sol. Sendo tais ambientes sujeitos a variações climáticas como secas parciais ou severas, estes nematoides possuem a capacidade adaptativa de tolerância à dessecação extrema (Shannon *et al.*, 2005).

Os nematoides anidrobióticos foram classificados em dois grupos, *estrategistas rápidos* e *lentos*. Os estrategistas lentos não são capazes de sobreviver à dessecação

imediate, necessitando de uma etapa de condicionamento com redução gradual na umidade relativa, permitindo assim a expressão dos genes da via de anidrobiose. Por sua vez, os estrategistas rápidos possuem capacidade de entrar em anidrobiose de maneira imediata, possivelmente devido a pré-adaptações no nível celular (Wormesley, 1987).

Indivíduos da espécie *P. superbus* são de vida livre, habitantes do solo, com aproximadamente 1 mm de comprimento, bacterívoros (se alimentam de bactérias) e classificados como estrategistas rápidos (Shannon *et al.*, 2005). Com este preceito, considera-se que os indivíduos desta espécie expressam constitutivamente os genes relacionados à anidrobiose (Reardon *et al.*, 2010).



Figura 3. Espécies do filo Nematoda. (A) Indivíduo da espécie *Panagrolaimus superbus* e (B) Indivíduo da espécie *Caenorhabditis elegans*.

1.3 O óxido de deutério

O óxido de deutério, também conhecido como *água pesada* ou *água deuterada*, é um composto químico que foi descoberto na década de 1930 por Urey, Brickwedde e Murphy (Urey, Brickwedde e Murphy, 1932). É formado por um átomo de oxigênio e dois de deutério (^2H ou ${}_1\text{D}$), um isótopo estável do hidrogênio cujo núcleo apresenta um próton e um nêutron (figura 4). Na natureza, a concentração de D_2O na água é de 0,015% ou 150 ppm (Katz, 1960; Kushner, 1999; Minamoto *et al.*, 2011 Kirkina, 2013).

Existe ainda um terceiro isótopo do hidrogênio, o trítio (^3H ou ${}_1\text{T}$). Sua diferença em relação aos outros isótopos é a presença de dois nêutrons no núcleo, além do próton (figura 4) (Kaufman e Libby, 1954). A presença do trítio na natureza pode ocorrer de duas formas principais: uma é o bombardeio da atmosfera por raios cósmicos, gerando átomos trítio a partir da quebra de átomos de nitrogênio. Tais moléculas na atmosfera são rapidamente oxidadas a T_2O (*óxido de trítio*, *água tritiada* ou *água superpesada*) ou HTO (*água semi-superpesada*) e podem precipitar na forma de chuva ou neve. Ou, o trítio, pode decair para hélio-3 (^3He) (Kaufman e Libby, 1954). (O decaimento de ${}_1\text{T}$ para ^3He , que possui um número atômico maior, é possível por meio do processo nuclear denominado decaimento β^- , vide Apêndice A).

Outra forma de ocorrência de trítio na natureza é a partir de rochas ígneas. A fissão espontânea do urânio libera nêutrons que podem reagir com pequenas quantidades ou traços de lítio (^7Li) formando trítio. Sendo radioativo, o trítio possui um tempo de meia-vida de 12,5 anos, decaindo para hélio-3 (^3He), um isótopo mais leve e menos abundante do hélio-4 (^4He) (Kaufman e Libby, 1954).

Por ser radioativo, altas doses de trítio, seja pela ingestão de água (semi-) superpesada ou por compostos orgânicos ligados a trítio (OBT), podem levar a problemas de saúde quando atingem uma eficácia biológica relativa (“*relative biological effectiveness*”) ou RBE (Harrison, 2009). Vários coeficientes de RBE para humanos foram calculados baseando-se em modelos biocinéticos e dosimétricos pela Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP). Sendo que esses coeficientes são específicos para diferentes tempos da vida do ser humano, desde ingestão fetal, até ingestão adulta (Harrison, 2009).

A molécula de água com o isótopo de hidrogênio mais abundante (referida a partir de agora como H₂O) e a água deuterada, ou pesada (referida como D₂O) apresentam propriedades físico-químicas distintas devido à diferença nas massas atômicas do hidrogênio e do deutério, resultando em uma diferença na ligação com o oxigênio, além da interação entre diferentes moléculas de água deuterada (Katz, 1960). Algumas dessas diferenças estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físicas da H₂O e D₂O (adaptado de Katz, 1960).

Propriedades	H ₂ O	D ₂ O
Ponto de Congelamento (°C)	0	3.82
Ponto de Ebulição (°C)	100.0	101,72
Densidade (20°C, g/mL)	0.9982	1.1056
Temp. de Densidade Máxima (°C)	4.0	11.6
Viscosidade (20°C, centipoise)	1.005	1.25
Tensão Superficial (25°C, dyn.cm)	71.97	71.93
Calor de Fusão (cal/mol)	1436	1515
Calor de Vaporização (cal/mol)	10 515	10 864

Nota: Superfície de Tensão entre D₂O e H₂O são essencialmente idênticas. 1 poise = 0.1 Pa.s; 1 dyn = 10 μN; 1 cal = 4.1858 J.

Nota-se que existem diferenças grandes entre algumas das propriedades físicas da H_2O e D_2O , como nos pontos de ebulição e congelamento, na temperatura de densidade máxima e na viscosidade. As diferenças na densidade a $20\text{ }^\circ\text{C}$ e na temperatura de densidade máxima pode revelar que a estrutura do D_2O no estado líquido ocupa um menor volume do que a H_2O na mesma temperatura, e isto implica que as ligações intermoleculares O-D (pontes de deutério) são mais curtas do que as ligações intermoleculares O-H (pontes de hidrogênio), portanto soluções de D_2O podem se comportar de maneira semelhante a soluções de H_2O em menor temperatura. Assim como, as maiores temperaturas de congelamento e ebulição, maior calor de fusão e vaporização sugerem que as ligações (ou pontes) de deutério são mais estáveis (fortes), necessitando de mais energia para sofrer alterações na sua conformação do que as ligações de hidrogênio (Katz, 1960).

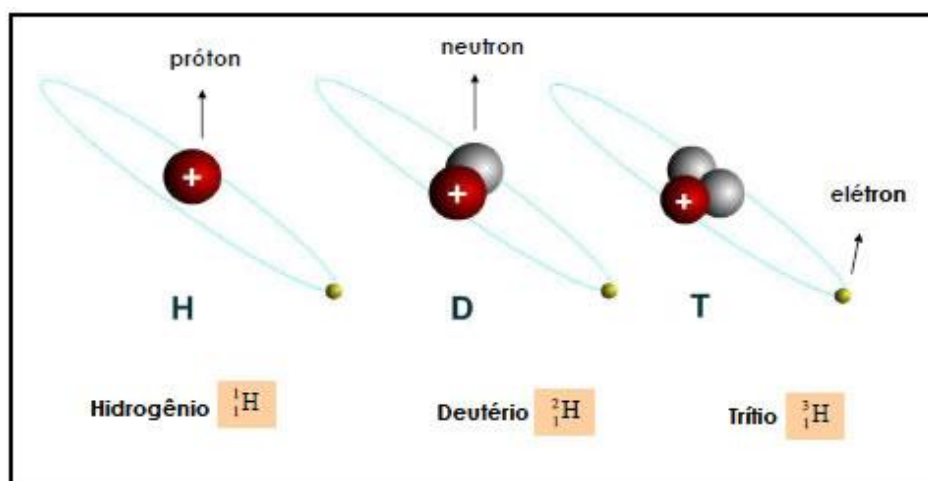


Figura 4. Modelos atômicos revelando as diferenças entre o hidrogênio e seus isótopos.

Considerando a ideia de que a estrutura da D_2O ocupa um menor volume, a solubilidade de sais e gases é menor do que em relação a H_2O na mesma temperatura,

visto que o soluto altera a conformação da estrutura da água para se acomodar (Katz, 1960).

Além de diferenças físicas, D₂O e H₂O apresentam também diferenças químicas, que podem ser de duas naturezas: efeito isotópico como solvente (“*solvent isotope effect*”) ou SIE, e efeito isotópico do deutério (“*deuterium isotope effect*”) ou DIE (Katz, 1962; Kushner, 1999; Hirai *et al.*, 2010).

O **efeito SIE** (solvente) é inerente às propriedades físicas do D₂O. Como apresentado anteriormente, alguns desses efeitos são a diminuição da solubilidade de sais e gases (Katz, 1960), as diferenças na viscosidade, densidade a 20 °C e temperatura de densidade máxima (ver tabela 1). As três últimas podem alterar a forma como um soluto interage com a concha de hidratação da D₂O se compararmos com a da H₂O. Tal comportamento diferente pode levar a diferenças na taxa de difusão de moléculas entre H₂O e D₂O ou diferenças na saturação máxima do mesmo composto.

Contudo, um dos efeitos mais abordados e de maior interesse biológico é a diferença na estabilidade das macromoléculas. Devido à diferença de densidade entre H₂O e D₂O e a mais forte interação entre as ligações de deutério do que as de hidrogênio, a estabilidade destas macromoléculas dissolvidas é alterada (sendo maior na D₂O). Outro fator que aumenta a estabilidade destas macromoléculas, caso essas possuam centros hidrofóbicos (*e.g.*, membranas biológicas) é que estes centros apolares permanecem mais fortemente coesos (Kushner *et al.*, 1999; Farver *et al.* 2001; Chellgren e Creamer, 2004; Goryunov, 2006; Kang *et al.*, 2006; Hohlefelder *et al.*, 2013).

O **efeito DIE** (isotópico) é devido a capacidade do átomo de deutério substituir o átomo de hidrogênio em biomoléculas (Kushner *et al.*, 1999; Cleland, 2004; Kang *et al.*, 2006; Hirai *et al.*, 2010; Hohlefelder *et al.*, 2013). A força de ligação entre carbono e

deutério (C-D) é, aproximadamente, 10 vezes maior do que com o hidrogênio (C-H), e pode afetar a reatividade do composto (Katz, 1960; Kushner *et al.* 1999). Dependendo do local da substituição, pode-se ter o efeito “primário” do DIE, quando a reação química depende da quebra da ligação C-D. Ainda pode ocorrer um efeito “secundário”, quando a substituição afeta a taxa de quebra da ligação C-H de outro resíduo, sendo o efeito “secundário” menor que o efeito “primário” (Kushner *et al.*, 1999).

A diferença na reatividade se dá pela diferença no nível de energia do ponto zero, que é a menor energia de ligação possível entre dois átomos. Este nível de energia do ponto zero depende da frequência de vibração das ligações no zero absoluto e é calculada por $\frac{1}{2} h\nu$, sendo ‘ h ’ a constante de Planck e ‘ ν ’ a frequência de vibração dos átomos envolvidos na ligação. Como o átomo de deutério tem o dobro da massa do átomo de hidrogênio, a frequência de vibração do deutério é menor que a do hidrogênio, assim o nível de energia do ponto zero nas ligações C-D é menor que nas ligações C-H, necessitando de maior energia para ser quebrada (figura 5) (Katz, 1960).

O DIE pode causar uma alteração na taxa de reatividade dos reagentes, tal mudança é expressa pelo “*kinect isotope effect*” ou **KIE** (Katz, 1960; Farver *et al.* 2001). O KIE é expresso pela relação entre as constantes de reação de quando os reagentes possuem o isótopo leve pela constante de quando os reagentes possuem o isótopo pesado (Katz, 1960).

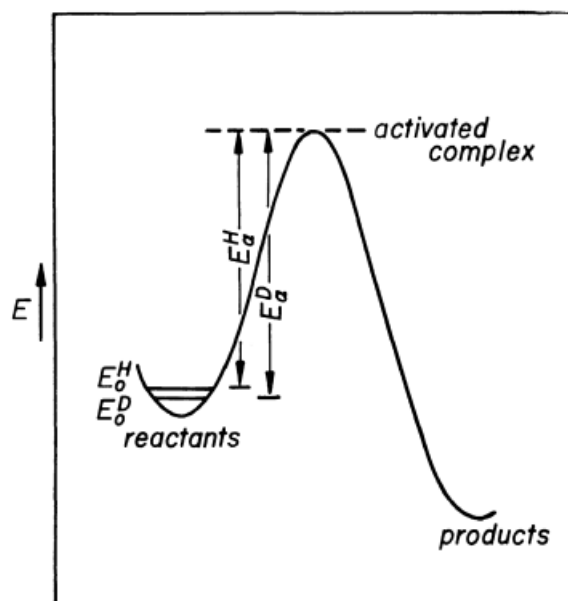


Figura 5. Diferença entre os valores de energia livre de Gibbs (E_0) entre reagentes hidrogenados (E_0^H) e deuterados (E_0^D). Observa-se que a energia livre de Gibbs dos reagentes deuterados é menor que a de reagentes hidrogenados, necessitando de mais energia para alcançar o complexo ativado (extraído de Katz, 1960).

Nem sempre é possível distinguir os efeitos do SIE e do DIE separadamente em sistemas biológicos pois uma vez que o organismo cresce em um ambiente com água deuterada (SIE) algumas moléculas terão átomos de hidrogênio substituídos pelo de deutério (DIE) (Kushner *et al.*, 1999)

Estudos sobre os efeitos da água deuterada foram realizados em função do tempo (Katz, 1960; Hirai *et al.*, 2010; Minamoto, Wada e Shimizu, 2012; Hammel *et al.*, 2013; Hohlefelder *et al.*, 2013 Kirkina *et al.*, 2014). Hammel e colaboradores observaram os efeitos no crescimento de *Drosophila melanogaster* cujo alimento possuía concentrações crescentes de D₂O. A 22,5% de D₂O eles observaram um aumento no tempo de desenvolvimento, redução da viabilidade e da fecundidade das fêmeas; curiosamente, a longevidade dos indivíduos não foi alterada (Hammel *et al.*, 2013).

Experimentos com algas mostraram que é possível haver uma proliferação de espécies deste grupo mesmo em altas concentrações de D₂O (99,9%), entretanto a

densidade máxima alcançada pela população é menor quando comparada ao crescimento em H₂O. Adicionalmente, as espécies necessitam de um tempo de adaptação ao meio deuterado (fase *lag* maior), variando de acordo com a espécie, sendo de alguns dias para *Chlorella vulgaris*, podendo chegar a meses para *Scenedesmus obliquus* (Katz, 1960).

Outros organismos como *Escherichia coli*, *Torulopsis utilis* (levedura), *Aspergillus niger* e *Penicillium notatum* (ascomicetos) também têm seu crescimento diminuído quando expostos a um meio com água deuterada. No caso da levedura *T. utilis* o crescimento só ocorre após adição de outros fatores nutricionais, como extratos de algas que também cresceram em meio deuterado (Katz, 1960).

Em mamíferos, Thomson (1960) e Katz *et al.* (1962) usaram ratos e camundongos como modelos, respectivamente, para a análise de alterações fisiológicas. O observado por eles foi que, primeiramente, a concentração corpórea de D₂O dos animais (após entrar em equilíbrio) era menor do que a concentração de D₂O fornecida (diluído na água para beber). Em ambos os casos os pesquisadores mediram a concentração de água deuterada na urina dos animais.

Alguns dos efeitos também observados, especialmente por Katz *et al.* (1962) foi que diferentes tecidos do animal possuíam concentrações distintas de deutério (fígado com uma das mais elevadas concentrações; o cérebro com baixa concentração). Além disso, foi mensurado o tempo de meia-vida do deutério no corpo dos animais e, assim como na absorção, o tempo de meia-vida varia entre os diferentes tecidos, sendo que os tecidos que absorvem mais rapidamente o deutério também são os que apresentam menor tempo de meia-vida e vice-versa (Katz *et al.* 1962).

Thomson (1960) encontrou uma hiperplasia de até 50% no fígado e de até 60% nas adrenais, um aumento na concentração de ureia sanguínea e uma dificuldade em

diminuir a concentração de glicose no sangue depois de 1 hora após injeções, sendo que após 5 horas, a concentração ficou abaixo do grupo controle. Adicionalmente, determinou-se o tempo de sobrevivência média em função da concentração de D₂O administrada em camundongos (figura 6) (Katz *et al.*, 1962).

Apesar da maioria dos trabalhos expor organismos ou sistemas biológicos a uma maior concentração de D₂O, Kirkina e colaboradores (2014) fizeram o contrário, usando água derretida e neve, que possui menor quantidade de deutério do que a água normal, mostraram que também pode haver diferenças nas atividades devido à baixa concentração de deutério na água. Por exemplo, a atividade de Na-K ATPase em uma concentração de 30 ppm de deutério diminuiu 12% em relação ao controle (de 145 ppm).

Outro exemplo é a de mobilidade de espermatozoides de boi (congelados) e de humanos (frescos) em menores concentrações de deutério (30 ppm para os de boi e 60 ppm para humano). Em ambos os casos a atividade máxima dos espermatozoides foi observada na solução controle (145 ppm) (Kirkina *et al.*, 2014).

Um experimento com a bactéria anaeróbica facultativa *Streptococcus mutans* crescendo em meios deuterados em concentrações de 75% e 100% mostrou uma inibição do crescimento, tanto na mensuração por turbidez quanto na mensuração de células viáveis pela resazurina redutase. Já a bactéria aeróbica *Pseudomonas aeruginosa* mostrou uma inibição do crescimento apenas nas primeiras 48h, sendo que o crescimento chegou à mesma magnitude que o controle depois de 72h (Hirai *et al.*, 2010).

Um dos efeitos do D₂O em processos enzimáticos pode ser ilustrado pelo trabalho de Minamoto, Wada e Shimizu no qual eles avaliaram a possibilidade de realizar uma epPCR (*error-prone polymerase chain reaction*) utilizando simplesmente uma solução de 99% D₂O como solvente ao invés de H₂O (sem alterações típicas, como adição de

EtBr, alteração na concentração de sais ou de nucleotídeos). O resultado foi uma taxa de erro seis vezes maior na condição com Mn^{2+} e quase oito vezes maior na condição sem Mn^{2+} , ambas em concentrações de 99% D_2O . O que foi proposto pelos autores para explicar a maior taxa de erro da polimerase foi a alteração da estabilidade da enzima, promovendo uma diminuição da especificidade da mesma pelo substrato, causado pelo SIE (Minamoto, Wada e Shimizu, 2012).

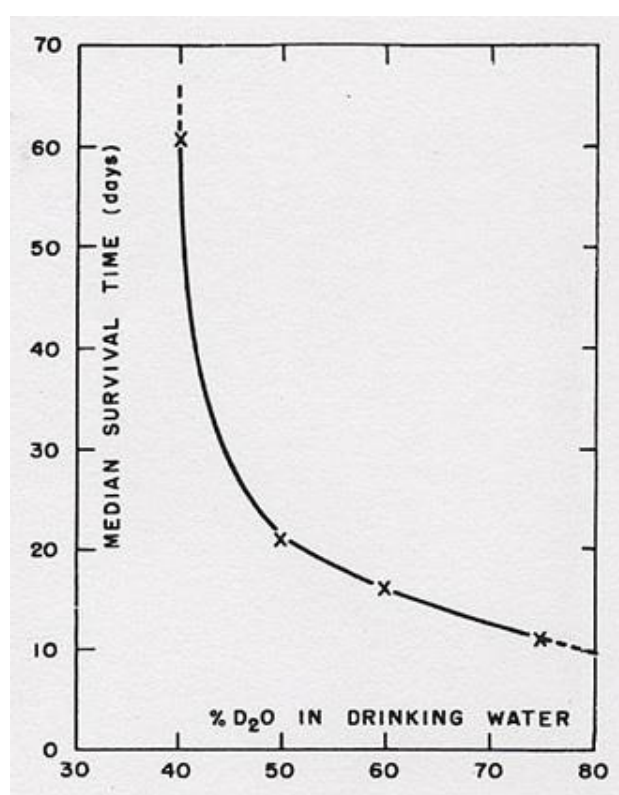


Figura 6. Média do tempo de sobrevivência de camundongos em função da concentração de D_2O diluído na água fornecida. O eixo horizontal se refere à concentração de D_2O fornecido, e no eixo vertical o tempo de sobrevivência médio em dias. Nota-se uma queda exponencial da longevidade com o aumento linear da dose de D_2O (Extraído de Katz *et al.* 1962).

Além da duplicação do DNA, também foi investigado o efeito da água deuterada na expressão gênica (figura 7). Utilizando um sistema *cell-free*, Hohlefelder *et al.* (2013), analisaram a expressão do gene GFP, em bactérias *E. coli*, nos diferentes níveis: transcrição, tradução e maturação (enovelamento) da proteína *in vitro*. No nível transcricional foi observado um aumento máximo de 250% da quantidade de mRNA de GFP a uma concentração de 40% de D₂O, de acordo com análises de RT-qPCR. No nível traducional, houve grande inibição, a uma concentração de 40% de D₂O, de acordo com mensurações de fluorescência da proteína.

Por sua vez, a taxa de enovelamento da proteína apresentou queda de 40% quando em meio contendo 60% de D₂O. Esta análise foi feita mensurando-se a fluorescência da proteína GFP após adição de cloranfenicol. Como esse antibiótico inibe a atividades dos ribossomos, qualquer aumento no sinal de fluorescência após este momento é devido ao enovelamento de proteínas já sintetizadas, permitindo, assim, a determinação da taxa de maturação da proteína.

Nossas hipóteses são: (i) que o D₂O interfere nas reações bioquímicas de duplicação do DNA, transcrição e digestão de DNA por DNase I; (ii) que o D₂O afeta a viabilidade do nematoide *Panagrolaimus superbus* imerso em 24 h nas concentrações de 75% e 99,9% de D₂O e (iii) que a viabilidade pós-reidratação nas mesmas concentrações de D₂O também é afetada.

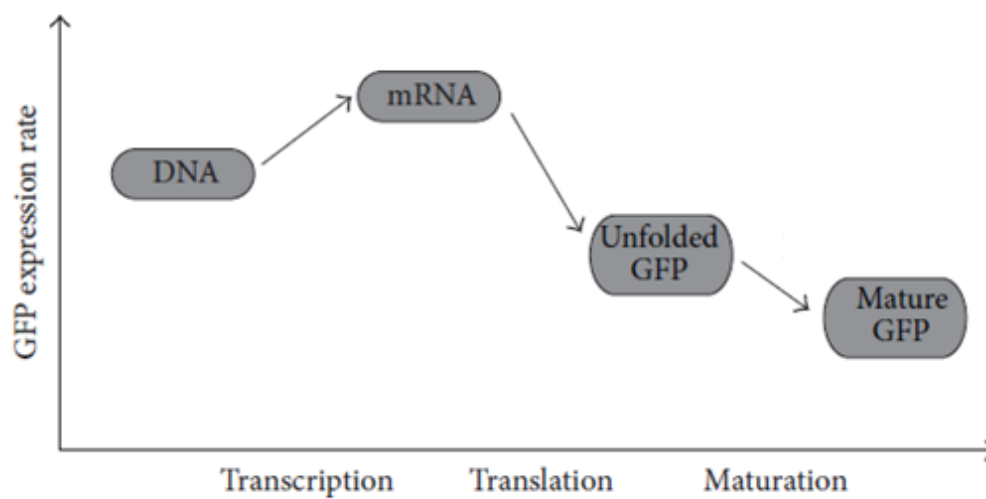


Figura 7. Influência da D₂O nos níveis da expressão gênica. Em um plano geral, a expressão gênica foi inibida pela presença da água deuterada, apesar de que em nível transcricional houve um aumento, nas etapas de tradução e maturação da proteína houve uma queda significativa (Hohlefelder *et al.*, 2013).

2. Objetivos

Objetivo Geral

O presente trabalho buscou investigar as eventuais alterações causadas pelo óxido de deutério na bioquímica de processos centrais para a célula assim como na biologia da anidrobiose.

Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de D₂O em processos enzimáticos reconstituídos *in vitro*: replicação do DNA, transcrição gênica e digestão do DNA.

- Avaliar se a reidratação de *P. superbis* com diferentes concentrações de D₂O afeta a viabilidade pós-anidrobiose.

- Avaliar se a imersão de *P. superbis* por 24 h em diferentes concentrações de D₂O afeta a viabilidade.

3. Materiais e Métodos

Dois fluxogramas gerais com o escopo dos experimentos envolvendo os materiais e métodos descritos a seguir são apresentados ao final desta seção (figuras 9 e 10).

3.1 Reações bioquímicas em óxido de deutério

3.1.1 Duplicação do DNA: PCR com D₂O

Os experimentos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizados em triplicata técnica em cinco condições distintas: (i) em H₂O (controle negativo); (ii) 15% D₂O; (iii) 30% D₂O; (iv) 45% D₂O e (v) 60% D₂O (concentrações finais nas reações).

O kit utilizado foi o *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega). O DNA molde utilizado para as reações foi o cDNA parcial do gene, do próprio *P. superbis*, para *Thymidylate Synthase* (Número de acesso no GenBank - GW408535.1), um gene importante no controle do ciclo celular, clonado no vetor pCR 2.1 TOPO (Invitrogen), a partir do qual foi gerado um amplicon de 413 pares de bases (pb). O óxido de deutério 99,9% foi adquirido da Sigma-Aldrich.

Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem:

- 0,8 µL de água livre de DNase e RNase
- 5 µL de tampão de reação (estoque: 5x concentrado; fornecido no kit)
- 0,5 µL dNTP mix (estoque: 10 mM)
- 2,5 µL de um mix dos iniciadores direto e reverso (estoque: 10 µM cada *primer*)
- 0,2 µL de GoTaq polimerase (estoque: 5 U/µL)
- 1 µL DNA molde (estoque: 30 ng/µL)
- 15 µL água (H₂O ou D₂O para concentrações finais previamente mencionadas)

As seqüências dos iniciadores são: direto 5' GGTGCTTGGGAATCCTGTTGAT 3'; reverso 5' AAAGGAGATTAACAGCCATATC 3'.

A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL na seguinte condição:

- 5 minutos a 94 °C (1 ciclo)
- 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 57 °C e 1 minuto a 72 °C (33 ciclos)
- 10 minutos a 72 °C (1 ciclo)

3.1.2 Reação de transcrição *in vitro* (IVT) com D₂O

Os experimentos de transcrição *in vitro* foram realizados em triplicata técnica com as mesmas cinco concentrações de D₂O avaliadas na PCR.

O DNA molde utilizado nas reações foi o controle interno do próprio *TranscriptAid™ T7 High Yield Transcription Kit* (Fermentas Life Sciences).

Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem:

- 6 µL água (H₂O ou D₂O para concentrações finais previamente mencionadas)
- 2 µL tampão de reação (estoque: 5x concentrado; fornecido no kit)
- 1 µL NTP mix (estoque: 25 mM)
- 0,5 µL DNA molde (estoque: 0,5 µg/µL)
- 0,5 µL T7 RNA polimerase (estoque: 1 U/µL)

As reações foram realizadas em um volume final de 10 µL, em um aparelho do tipo termociclador, a 37 °C por 2 h. Em seguida acrescentou-se 30 µL de água livre de DNase e RNase para diluir o produto da reação.

3.1.3 Reação de digestão com DNase I

Os experimentos de digestão com DNase I foram realizados em triplicata técnica com as mesmas cinco concentrações que as reações de PCR e IVT. Adicionalmente foi realizada uma reação sem DNase (controle negativo).

O DNA molde utilizado nas reações foi o cDNA parcial do gene *Guanylate Kinase Family protein* (número de acesso GenBank - GW408248.1), uma família de kinases relacionada ao crescimento e alongamento de cadeias de glicoproteínas na membrana celular, cujo inserto de 441 pb está clonado no vetor pDNR-Lib (Clontech). O kit utilizado para avaliação foi o *DNase I, RNase free* (Thermo Fihser Scientific).

Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem:

- 12 µL de água (H₂O ou D₂O para conc. finais previamente mencionadas)
- 2 µL de tampão de reação (estoque: 10x concentrado; fornecido no kit)
- 5 µL DNA molde (estoque: 30 ng/µL)
- 1 µL de DNase I (estoque: 1 U/µL)

As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL em aparelho do tipo termociclador por 15 minutos a 37 °C e posteriormente 10 minutos a 95 °C para inativação da enzima. Em seguida acrescentou-se 4 µL de *Loading Buffer* (estoque: 6x concentrado). O tempo entre a adição da enzima e o início da reação em termociclador foi de 3 minutos.

3.2 Eletroforese e densitometria

Alíquotas das reações (10 µL da PCR; 1 µL da IVT diluída; 10 µL da digestão com DNase I) foram submetidas a eletroforese em dois géis de agarose 1% corados com Sybr Safe (Invitrogen) na seguinte configuração: 100 V, 80 mA por 15, 25 e 30 minutos (para os produtos da PCR, digestão com DNase I e da IVT, respectivamente).

A densitometria foi realizada com auxílio do software ImageJ para geração de dados numéricos referentes aos géis. A captura de imagens dos géis é feita através de um equipamento embutido na visualização dos mesmos que possui uma câmera. A foto, então, é salva em um cartucho de memória (semelhante ao de uma câmera digital) permitindo a análise em *softwares* de computador.

3.3 Manutenção de *P. superbus*

Os vermes foram mantidos em placas de Petri contendo meio NGM (*Nematode Growth Medium*) ágar com uma camada de bactérias *Escherichia coli* da linhagem OP50, para alimentação, a 20 °C, no escuro.

3.4 Obtenção de uma população homogênea de larvas L2

Uma cultura mista de *P. superbus* (*i.e.*, contendo machos e fêmeas em todas as etapas do desenvolvimento) foi coletada e lavada três vezes com tampão M9 para retirada do excesso de bactérias, sendo cada lavagem composta por adição de um grande volume de M9 (10-30 mL), espera de 15 minutos para decantação dos vermes e dos ovos e retirada do sobrenadante. Em seguida esta população foi exposta a uma solução de *bleaching*,

(NaOH 0,5 M e NaClO 0,9%) por aproximadamente 9 minutos, com agitação em aparelho do tipo *vortex* a cada minuto, para desintegração dos vermes, restando apenas os ovos.

Após os 9 minutos a solução foi centrifugada durante 1 minuto a 2.325 x g, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 10 mL de água destilada. Este procedimento foi repetido por 3 vezes para remoção da solução de *bleaching*. Os ovos foram então plaqueados e encubados em estufas de cultivo como já descrito acima.

Uma cultura sincronizada no estágio larval 2 (L2), cerca de 24 a 72 h após o plaqueamento dos ovos (Evangelista,2011; Guidelli, 2011), foi coletada do meio de cultivo e lavada três vezes com tampão M9, como já descrito acima para retirada do excesso de bactérias.

3.5 Desafio de dessecação das larvas L2

Larvas L2 foram imobilizadas em uma membrana de filtro Supor 0,45 µm (Sigma-Aldrich) por filtração a vácuo em um funil de sartório. Cada membrana, isoladamente, foi depositada em um microtubo de 1,5 mL e submetida a diferentes umidades relativas (RH): 24 h em uma solução saturada de CuSO₄ (98% RH); 24 h em sílica gel (10% RH).

O passo seguinte (pré-reidratação em vapor de água por 24 h - 100% RH) foi feita em: (i) H₂O destilada (controle positivo), (ii) 75% D₂O v/v (em água destilada) ou (iii) 99,9% D₂O.

Em seguida (reidratação) os vermes foram imersos por 24 h em tampão M9 preparado em: (i) H₂O destilada (controle positivo), (ii) 75% D₂O v/v (em água destilada) ou (iii) 99,9% D₂O. O experimento foi realizado em triplicata técnica, sendo cada replicata composta por ~400 vermes.

3.6 Determinação da viabilidade

A determinação da viabilidade foi realizada via coloração com Eritrosina B (0,4% m/v em tampão M9) durante um período de 1 h. Após esse período foram realizadas lavagens das amostras com tampão M9 para retirada do excesso de corante. A morte dos organismos promove alterações nas propriedades da membrana plasmática de suas células, resultando na perda da permeabilidade seletiva das mesmas, e consequentemente na entrada do corante nas células mortas. A coloração avermelhada adquirida pelas células mortas vistas ao microscópio óptico permite a distinção entre vermes vivos e mortos. A partir disso foram feitos cálculos da porcentagem de viabilidade dividindo-se o número de vermes vivos pelo total de vermes na amostra (figura 8).



Figura 8. Micrografia da coloração de vermes após a reidratação para cálculo da viabilidade.

3.7 Viabilidade de vermes imersos em H₂O / D₂O por 24 h

Para determinar o efeito de H₂O / D₂O na viabilidade dos vermes (sem o envolvimento da anidrobiose), populações mistas de *P. superbus* foram expostas durante 24 h em tampão M9 (preparado com H₂O ou diferentes concentrações de D₂O).

Vermes provenientes de uma cultura mista foram imobilizados em filtro (como descrito anteriormente) e imersos por 24 h em tampão M9 preparado com: (i) H₂O; (ii) 75% D₂O v/v (em água destilada) ou (iii) 99,9% D₂O. Após 23 h foi adicionado o corante Eritrosina B. O experimento foi realizado em triplicata técnica, sendo cada replicata composta por ~400 vermes.

Após esse período determinou-se a viabilidade da população como um todo e, especificamente, das larvas L2. Para isso utilizamos o programa ScopePhoto, que permite determinar a espessura dos vermes e, conseqüentemente, categorizá-los nas diferentes fases larvais (L1-L4) (Apêndice B) (Evangelista, 2011; Guidelli, 2011).

3.8 Análise dos Dados

Todos os experimentos (*in vitro* e *in vivo*) foram conduzidos em triplicatas técnicas para geração de médias e desvios-padrão. Em seguida foram realizadas análises estatísticas assumindo $p \leq 0,05$ como significativo.

Os valores numéricos de densitometria foram normalizados pelo valor da média dos respectivos controles positivos, estabelecida como 100%. Esses valores foram submetidos ao teste de ANOVA seguidos pelo Teste T de *Student*.

Em relação ao ensaio com DNase I, a densitometria foi realizada apenas para a reação sem enzima (sendo a média definida como 100%). Devido à ausência de sinais visíveis no gel, e para evitar falsos positivos causados pela fluorescência de *background* do gel, a densitometria não foi realizada para os outros grupos deste ensaio.

Os resultados dos ensaios de viabilidade (imersão ou reidratação com H₂O ou D₂O) foram submetidas ao teste de ANOVA seguido pelo Teste T de *Student*.

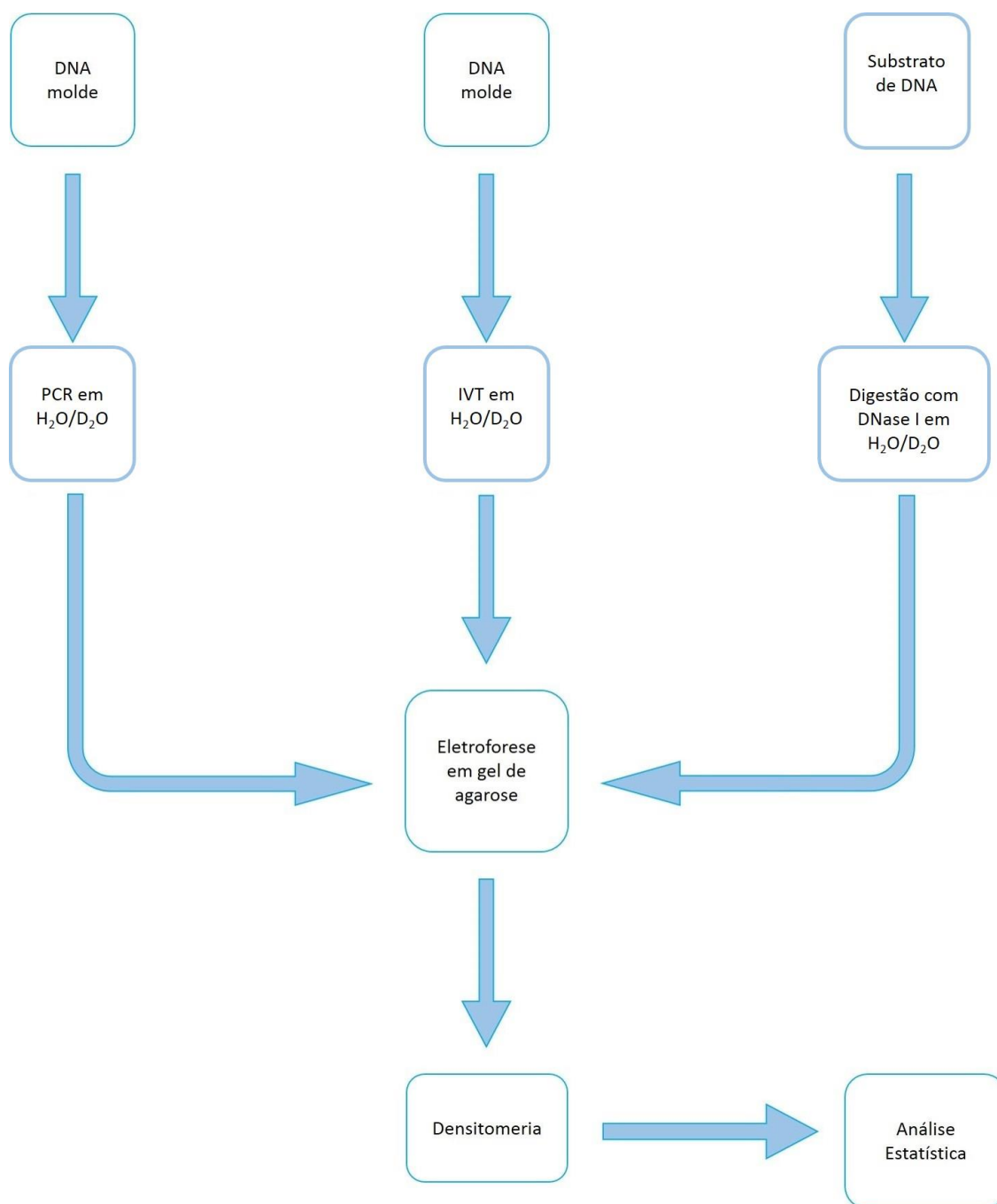


Figura 9. Fluxograma com os procedimentos gerais das reações bioquímicas em óxido de deutério.

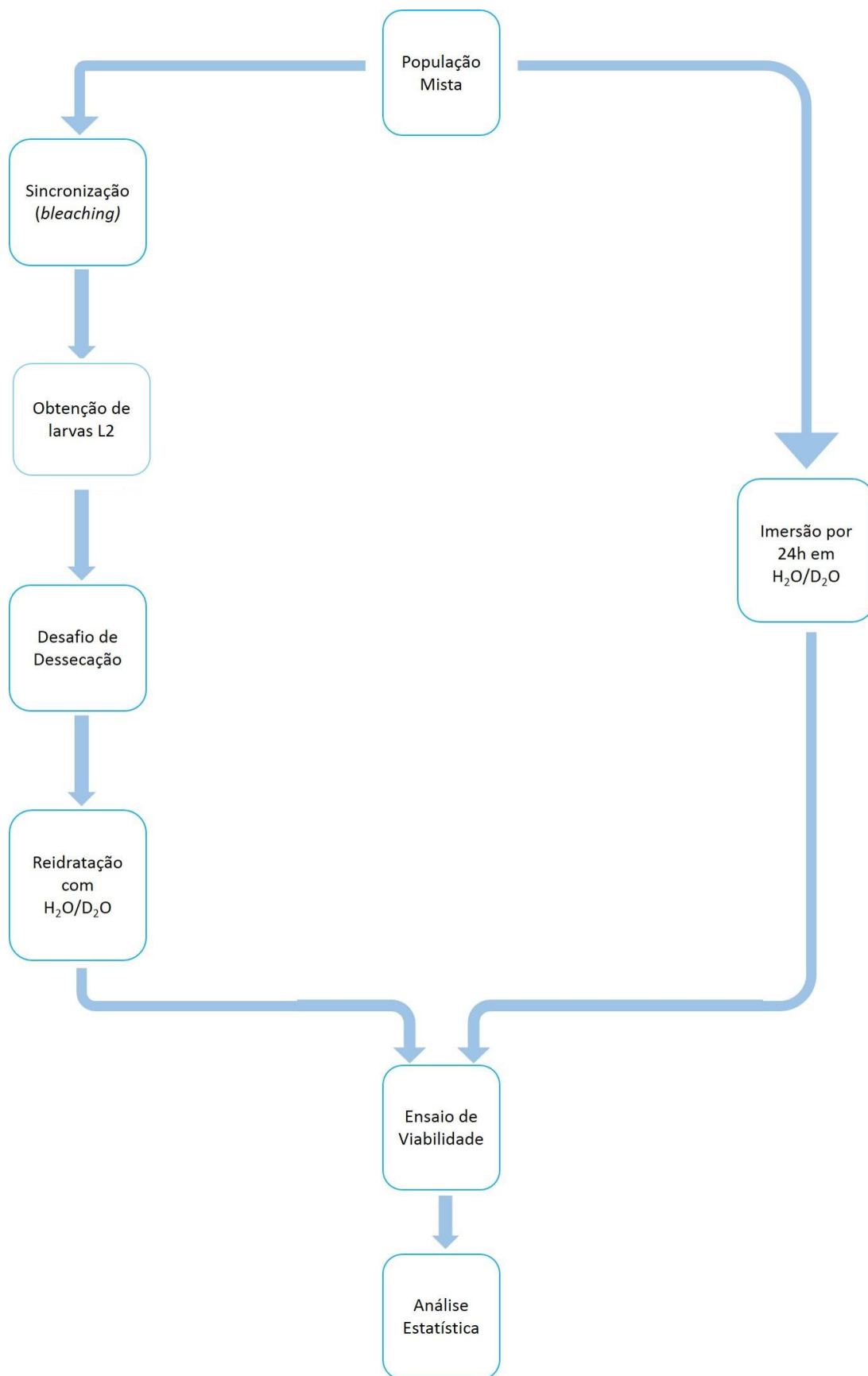


Figura 10. Fluxograma com os procedimentos gerais referentes aos ensaios *in vivo* com óxido de deutério.

4. Resultados

4.1 Efeitos do D₂O em reações bioquímicas

4.1.1 Duplicação do DNA (PCR)

Os valores das médias e desvios-padrão das PCRs realizadas em diferentes concentrações de D₂O são mostrados na figura 11. A eficiência da reação foi determinada de acordo com a abundância do amplicon no gel (densitometria, Apêndice C).

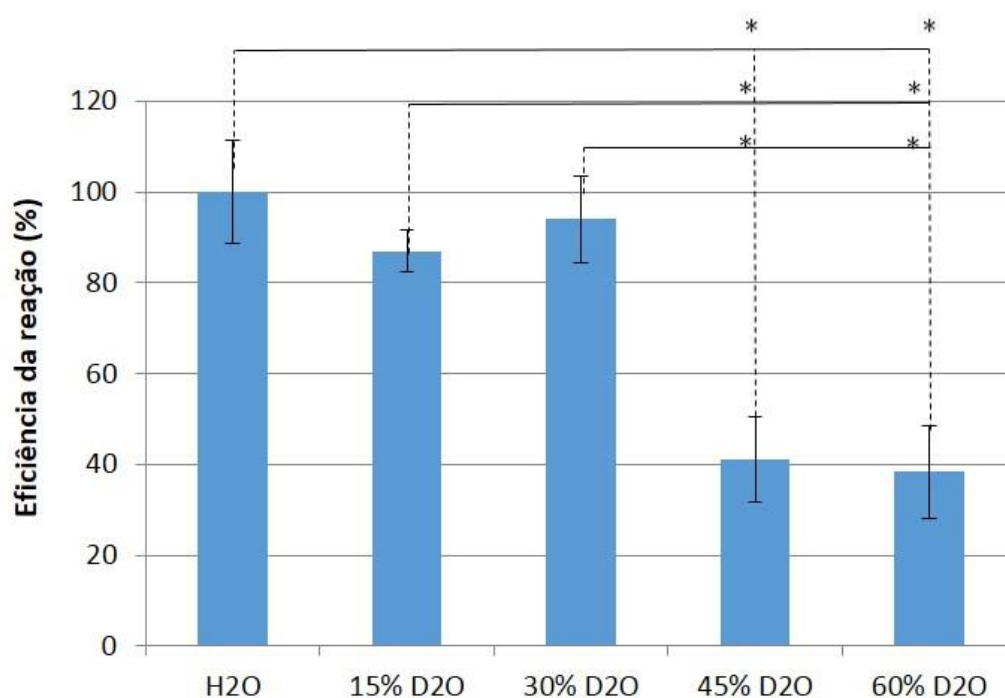


Figura 11. Efeitos do óxido de deutério na duplicação do DNA (PCR). * $p < 0,05$ (ANOVA).

4.1.2 Transcrição *in vitro*

Os valores das médias e desvios-padrão das IVTs realizadas em diferentes concentrações de D₂O são mostrados na figura 12. A eficiência da reação (perceptível por observação direta, Apêndice D) foi quantificada de acordo com a abundância do transcrito no gel (densitometria, Apêndice E).

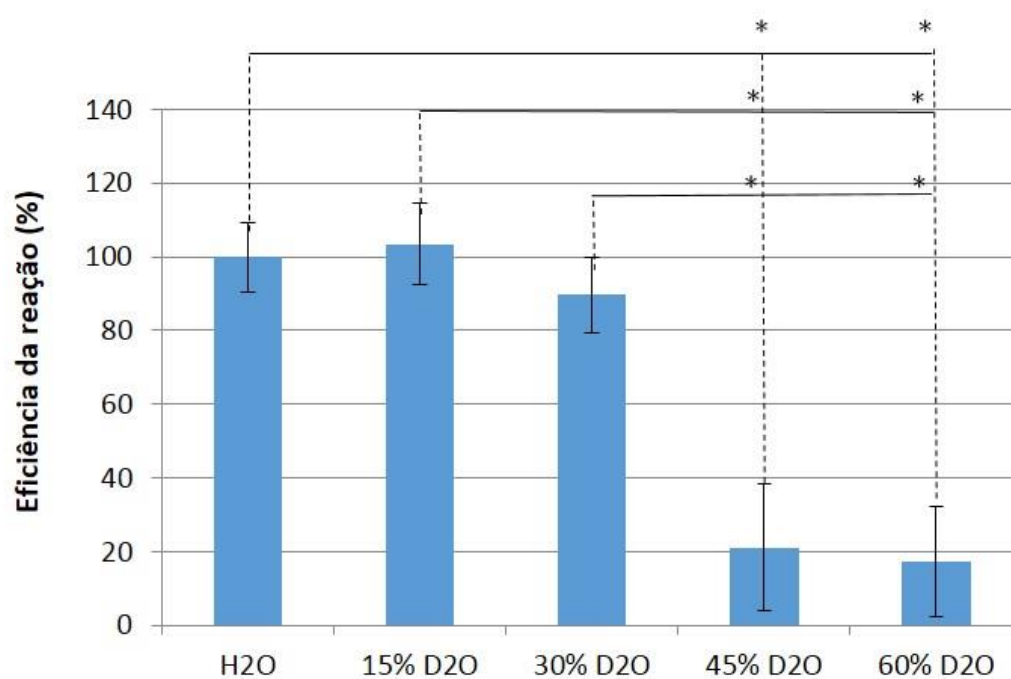


Figura 12. Efeitos do óxido de deutério na transcrição *in vitro*. * $p < 0,05$ (ANOVA).

4.1.3 Digestão com DNase I

A imagem da eletroforese das reações de digestão com *DNase I* são mostrados na figura 13. Devido à ausência de sinais (exceto no controle negativo) a densitometria não foi realizada.

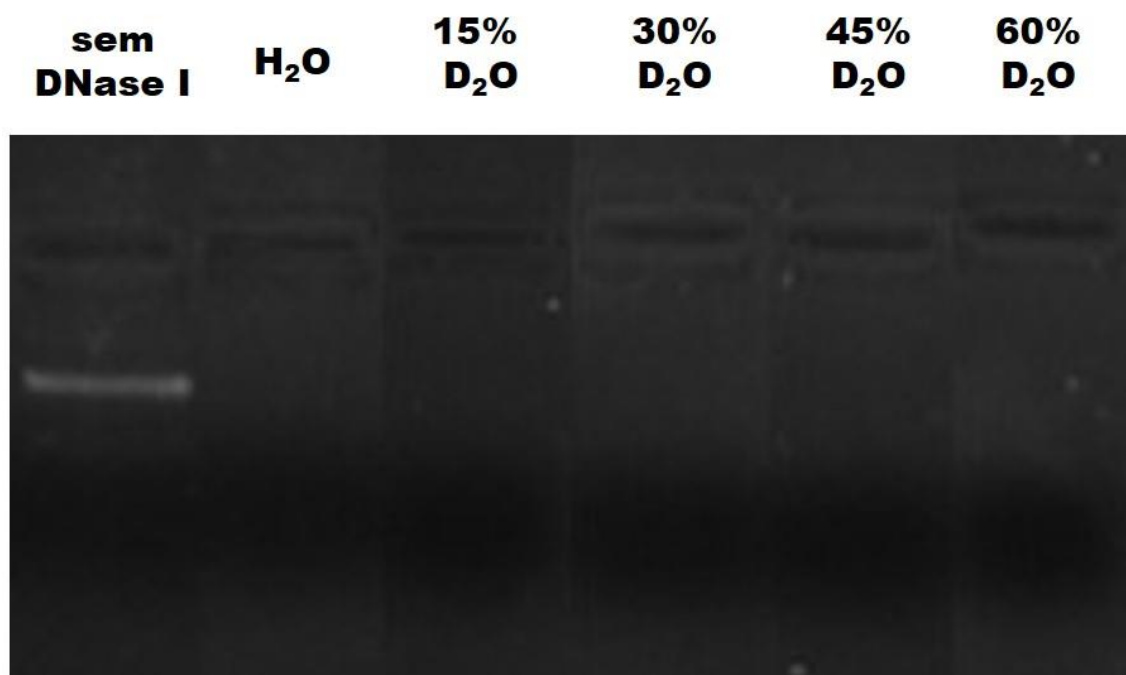


Figura 13. Eletroforese das reações de digestão por DNase I. Da esquerda para a direita: Controle negativo (sem enzima); reação em H₂O; 15% D₂O; 30% D₂O; 45% D₂O e 60% D₂O.

4.2 Efeitos na viabilidade de *P. superbus*

4.2.1 Larvas L2 dessecadas e reidratadas com H₂O / D₂O

Os dados de viabilidade do experimento de dessecação de larvas L2 seguida por reidratação com tampão M9 preparado com H₂O destilada, 75% D₂O ou 99,9% D₂O estão apresentados na figura 14. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

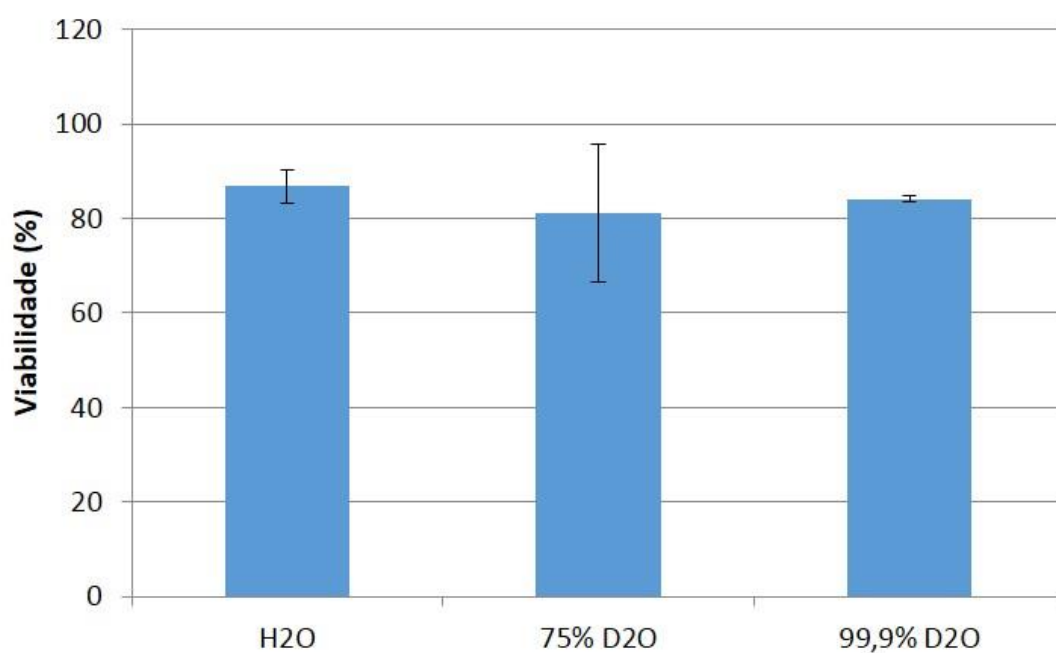


Figura 14. Viabilidade de larvas L2 dessecadas e reidratadas com diferentes concentrações de D₂O.

4.2.2 Larvas L2 (não dessecadas) imersas por 24 h em H₂O / D₂O

Os dados de viabilidade das larvas L2 que ficaram imersas em H₂O / D₂O estão apresentados na figura 15. Para os dados de “população mista” e “comparação com L2”, vide Apêndices F e G, respectivamente.

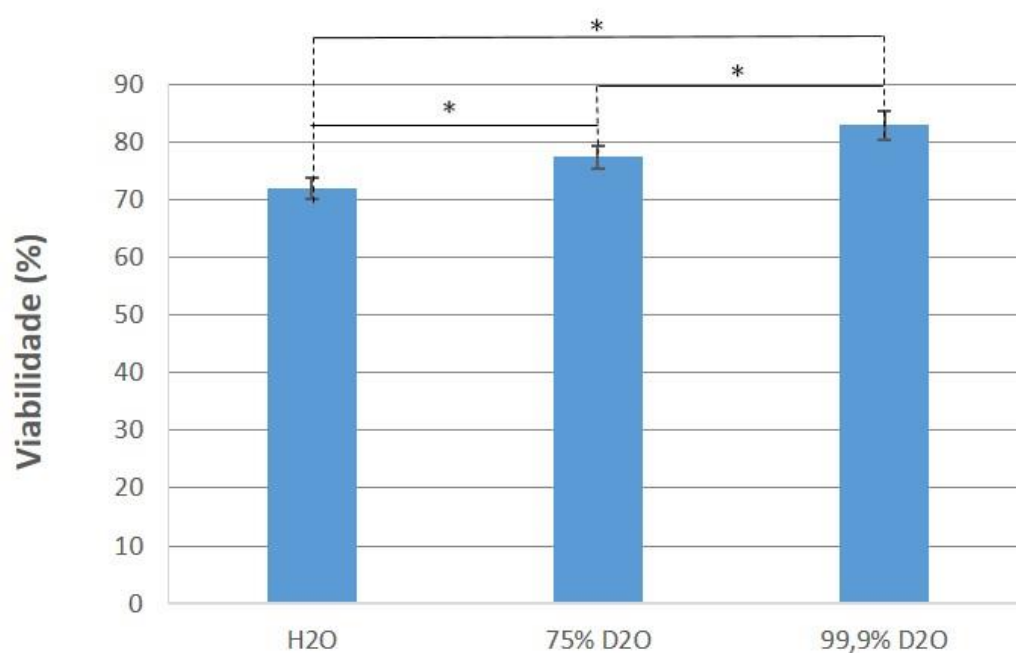


Figura 15. Viabilidade de larvas L2 imersas por 24 h em H₂O/D₂O. * $p < 0,05$ (ANOVA).

4.2.3 Comparação entre larvas L2 dessecadas-reidratadas com H₂O / D₂O versus larvas L2 imersas por 24 h em H₂O / D₂O

A comparação entre os grupos de larvas L2 que passaram pelo desafio de dessecação-reidratação com H₂O / D₂O versus o grupo de larvas L2 que foram imersas em H₂O / D₂O por 24 h (sem terem passado pelo desafio de dessecação) está mostrado na figura 16.

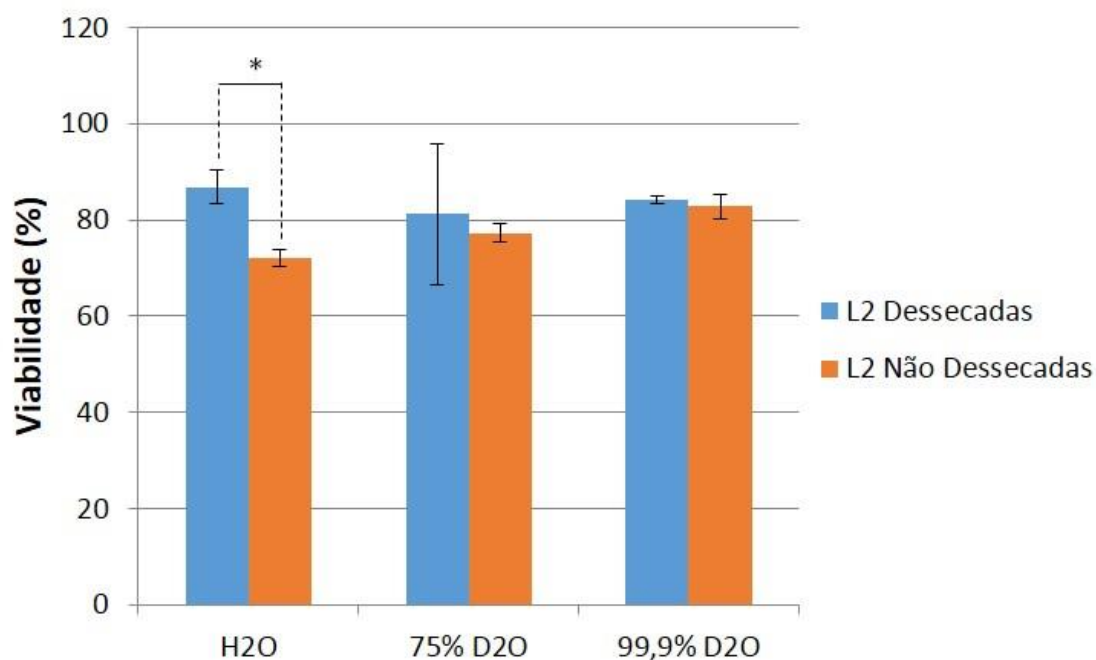


Figura 16. Efeito do D₂O na viabilidade pós-reidratação versus pós-imersão. * $p < 0,05$ (ANOVA).

5. Discussão

5.1 Efeitos do óxido de deutério na replicação, transcrição e digestão com DNase I

Estudos sobre o efeito de D₂O em processos celulares relacionados à replicação do DNA e transcrição gênica são escassos na literatura (Hohlefelder *et al.*, 2013). Contudo, alguns desses trabalhos mostraram, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que a substituição do solvente H₂O por D₂O pode alterar significativamente esses eventos.

Entre esses podemos citar o trabalho de Minamoto e colaboradores (2012), que propuseram um novo protocolo de epPCR, isto é, um tipo de PCR no qual a fidelidade da enzima Taq DNA polimerase é diminuída a fim de gerar mutações aleatórias durante os ciclos da reação. A epPCR é utilizada para, por exemplo, gerar diversidade molecular em bancos de cDNAs de enzimas de interesse industrial. Esse novo conjunto de enzimas pode então ser sondado afim de se encontrar variantes cujas características bioquímicas sejam de interesse (*e.g.*, catálise preservada mesmo em valores extremos de pH, salinidade ou temperatura).

Tipicamente a epPCR é realizada alterando-se a concentração de sais como MgCl₂, adição de MnCl₂, modificando a quantidade da própria Taq, ou ainda, desbalanceando as concentrações entre os dNTPs. Minamoto e colaboradores (2012) desenvolveram um novo protocolo de epPCR simplesmente usando óxido de deutério como solvente da reação em altas concentrações (98% e 99%).

A maior taxa de erro em epPCR encontrada por Cadwell e Joyce (1992), alterando a concentração de sais, desbalanceando as concentrações entre os dNTPs, entre outras modificações, foi de $1,3 \times 10^{-2}$ erro/pb. Por sua vez, Minamoto e colaboradores (2012) obtiveram uma taxa de $1,8 \times 10^{-3}$ erro/pb simplesmente utilizando D₂O como solvente. Esta taxa, segundo os autores, pode ser aumentada caso seja feito uma nova rodada de epPCR com D₂O ou ainda combinando este método com outros.

Contudo, estes dois trabalhos avaliaram especificamente as taxas de erro da polimerase, não focando sobre a eficiência na amplificação de DNA durante os ciclos. Os dados do presente trabalho mostram que em concentrações de 45% e 60% de D₂O a quantidade de DNA sintetizada foi aproximadamente 60% menor do que o controle (o motivo desta diminuição será abordado a seguir, juntamente com os dados da transcrição *in vitro*).

Por outro lado, análises do efeito de D₂O em três níveis da expressão gênica (transcrição, tradução e enovelamento) da proteína GFP foram avaliadas em diferentes concentrações de D₂O (0%, 20%, 40% e 60%) por Hohlefelder e colaboradores (2013). Curiosamente, os resultados encontrados para a transcrição de GFP são opostos aos encontrados em nossos experimentos.

Enquanto a quantidade de transcritos nos experimentos com GFP aumentou 1,5 vez (em média) em relação ao controle a 40% de D₂O (Hohlefelder *et al.*, 2013), nossos dados revelam uma diminuição da eficiência na reação de transcrição de aproximadamente 80% em relação ao controle em concentração semelhante (figura 12). Apesar de resultados diametralmente opostos, os dois trabalhos mostram claramente que ocorre uma alteração no processo de transcrição em meio com óxido de deutério.

A redução na eficiência da reação da duplicação do DNA e da transcrição de mRNA deste trabalho pode ser explicada pelo SIE pois, como já descrito na literatura, o D₂O interage com as enzimas de forma diferente da H₂O. A maior intensidade da interação intermolecular do deutério (ligação de deutério) quando comparada com a do hidrogênio (ligação de hidrogênio), pode ter deixado as polimerases (Taq DNA Polimerase e T7 RNA polimerase) estruturalmente menos flexíveis, dificultando sua ação e interação com o substrato de DNA. Isso levaria a uma menor síntese de DNA e mRNA

na PCR e na IVT, respectivamente. Adicionalmente, o substrato das reações (DNA) também estava imerso em uma matriz de D₂O, isso pode ter aumentado a estabilidade da dupla hélice dificultando a separação das duas cadeias, evento necessário tanto na duplicação quanto na transcrição.

Este efeito de solvente já é bem descrito na literatura, alterando a estabilidade das estruturas tridimensionais das moléculas orgânicas como proteínas, membranas biológicas e ácidos nucleicos. Contudo, como a catálise enzimática e o papel biológico das membranas envolvem, respectivamente, alterações na estrutura tridimensional e fluidez, nota-se que o óxido de deutério pode interferir de maneira significativa nos processos biológicos, portanto, uma hipótese é que, em D₂O as enzimas se tornariam estruturalmente mais rígidas e, conseqüentemente, cataliticamente menos ativas (Kushner *et al.*, 1999; Farver *et al.* 2001; Chellgren e Creamer, 2004; Goryunov, 2006; Kang *et al.*, 2006; Hohlefelder *et al.*, 2013).

As diferenças entre nossos resultados e os de Hohlefelder e colaboradores (2013) para a transcrição podem ser devidos a alguns aspectos. Primeiramente, os kits utilizados são diferentes: nós utilizamos um kit comercial de IVT de alto rendimento e finamente otimizado (tampão de reação padronizado), visando a produção de elevados níveis de transcrito. Portanto, é esperado que mínimas alterações devem afetar significativamente a eficiência do kit. Por outro lado, o sistema *cell-free* de Hohlefelder e colaboradores tende a ser mais flexível por ser, essencialmente, um lisado celular temporariamente estabilizado. Esse ambiente celular, composto por diversos outros elementos (membranas, organelas, etc) poderiam minimizar os danos do D₂O sobre a RNA polimerase.

Adicionalmente, neste sistema *cell-free system* há a síntese contínua de proteínas, incluindo DNA e RNA polimerases. Portanto, em um meio deuterado pode haver a incorporação de átomos de deutério nessas polimerases, configurando o efeito de DIE. A presença de uma ou mais ligações C-D na RNA polimerase em certos domínios específicos poderia facilitar a interação da enzima com o DNA (já que a ponte de deutério é mais forte) intensificando, assim, a transcrição.

A única exceção encontrada nas reações bioquímicas avaliadas foi a enzima DNase I. Esta enzima não teve sua atividade afetada pelas concentrações testadas de D₂O capazes de interferir na duplicação e transcrição.

As DNases são um grupo de enzimas que, ao decorrer da evolução, tiveram sua seleção baseada em degradar DNA em diferentes ambientes moleculares. Este combate pode ser feito tanto em ambiente intra- quanto extracelular (*e.g.*, pele do corpo). Desse modo, a ação da DNase I em ambientes não muito constantes (grande variação de pH, temperatura, osmolaridade) requer da enzima uma flexibilidade de atuação grande para poder realizar sua função de maneira efetiva. Assim, é possível que essa característica tenha permitido sua funcionalidade mesmo em D₂O.

Sumarizando, nossos dados e a literatura evidenciam que o D₂O afeta, frequentemente de maneira negativa, os processos enzimáticos. Contudo, a real consequência dependerá da natureza da enzima (*e.g.*, DNA polimerase versus DNase I) e do sistema biológico (*e.g.*, certos kits de RNA polimerase versus *cell-free system*).

5.1 Efeitos do D₂O na biologia de *P. superbis*

Não há registros na literatura de estudos buscando relacionar efeitos da água deuterada no fenômeno da anidrobiose, ou ainda de seus efeitos na biologia de *Panagrolaimus superbis*.

A partir de dados de viabilidade média de camundongos, os quais tiveram expectativa de vida média de 10 dias com administração de 75% D₂O (Katz *et al.*, 1962), extrapolamos (com base no tempo de vida de *P. superbis*) que em aproximadamente 5 - 6,5 h seriam observados decréscimos de viabilidade em nosso modelo.

Outros autores também reportaram viabilidade média de outros modelos em determinadas concentrações de D₂O. Administrando D₂O a 50%, também de maneira contínua, no modelo *Drosophila melanogaster*, a menor viabilidade encontrada foi de cerca de 10 dias a 10 °C (Samis, Baird e Massie, 1973). Adicionalmente, utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo, Hughes, Hildebrath e Becker (1963), submeteram três casais em concentrações de 0% a 100% de D₂O (com intervalos de 10% em 10%). Os resultados mostraram que os casais expostos em meios de culturas com alimento, nos quais a H₂O foi substituída por D₂O, igual ou superior a 70% de D₂O morreram dentro de um período de três dias a 25 °C. Todos esses trabalhos mostram que seriam grandes as chances de em 24 h haver efeitos na viabilidade de *P. superbis*.

Contudo, nossos dados revelaram que a exposição dos vermes em altas concentrações de D₂O por 24 h não afetaram a viabilidade, tanto se analisarmos uma população mista (Anexos F) quanto o estágio L2 do desenvolvimento (figura 15).

A espécie *P. superbis*, segundo a literatura, é classificada como um anidrobioto do tipo *estrategista rápido*, *i.e.*, consegue adentrar ao estado de anidrobiose sem necessidade de pré-adaptação (Shannon *et al.*, 2005). É proposto que estes estrategistas

rápidos expressam constitutivamente genes de resposta ao estresse hídrico extremo (que leva, naturalmente, a diversos outros tipos de estresses - osmótico, oxidativo, pH, danos no DNA e proteínas etc) (Wormsley, 1987; Reardon *et al.*, 2010). Esta maquinaria celular já presente poderia combater os danos causados pelo D₂O, explicando a não interferência na viabilidade no período de 24 h.

Outra possibilidade é que as concentrações internas de D₂O nos órgãos e tecidos de *P. superbis* não tenham sido elevadas a um limiar suficiente para causar danos letais dentro de um período de apenas 24 h de imersão. Katz e colaboradores (1962), por exemplo, evidenciaram que diferentes órgãos de camundongos absorvem D₂O diferencialmente durante um mesmo período de tempo de exposição.

Alternativamente, é tentador sugerir que *P. superbis* imerso seria capaz de detectar (físico-quimicamente) o D₂O no meio, levando-o a um bloqueio intencional da atividade faríngea (ingestão de água), interrompendo a troca da matriz aquosa corpórea de H₂O por D₂O. Isto, por sua vez, evitaria os danos internos e, conseqüentemente, efeitos na viabilidade. Já foi encontrado por Tyson *et al.*, (2012), que durante a dessecação, o gene *spx/ral-2* é expresso, membros dessa família de genes estão relacionados com o engrossamento da cutícula na faringe de nematoides de hábito parasita (Tyson *et.*, 2012). Esse engrossamento da cutícula, no cenário de exposição ao D₂O poderia diminuir a ingestão, ou torna-la mais lenta, contribuindo para minimizar os efeitos nocivos do D₂O. Entretanto são necessários ensaios mais específicos para se investigar essa possibilidade.

Por fim, é possível que nossa extrapolação inicial esteja simplesmente equivocada, sendo necessário um tempo superior a 24 h para que haja danos suficientes para afetar a viabilidade. Contudo, ensaios mais longos poderiam levar a fome e outras alterações fisiológicas, dificultando uma avaliação precisa do efeito isolado de D₂O.

É importante também mencionar que o aumento da viabilidade observado (figura 15) é, possivelmente, um simples artefato, já que em todos os estudos envolvendo exposição de organismos vivos a altas concentrações de D₂O houve diminuição da viabilidade ou inibição do crescimento (Katz, 1960; Thomson, 1960; Katz *et al.*, 1962; Hughes *et al.*, 1963; Samis *et al.*, 1973; Hirai, 2010; Hammel, 2013). Contudo, de maneira menos provável, não seja um artefato (mas sim real), evidenciando que a biologia singular de organismos anidrobióticos seja favorecida em condições adversas, tal como ambiente com óxido de deutério.

Também não se encontrou queda na viabilidade dos grupos dessecados-reidratados com D₂O. Diferentemente da imersão, os eventos de dessecação e reidratação geram uma troca da matriz aquosa do organismo de uma maneira *instantânea, homogênea e total*. A não letalidade pode ser devida à maquinaria de reparo já presente, como mencionado anteriormente. Alternativamente, como sugerido pelos dados de imersão, a exposição destes vermes por apenas 24 h em D₂O não leva à morte (ou a letalidade, mantendo-se a matriz de D₂O, ocorreria apenas em um período posterior).

Em síntese, a exposição a D₂O por 24 h não é letal para *P. superbus*. Portanto, ou (i) os efeitos na viabilidade só ocorrem após períodos mais longos de exposição ou (ii) a biologia singular deste verme, hidratado ou dessecado, não é afetada por uma matriz de óxido de deutério. Novas pesquisas serão necessárias para esclarecer essas hipóteses.

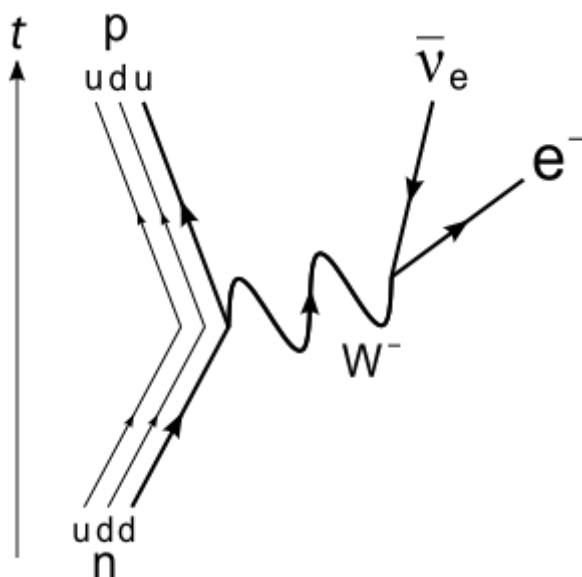
Os dados produzidos neste trabalho mostraram que nossas hipóteses da interferência do D₂O na eficiência da duplicação de DNA, transcrição e digestão de DNA por DNase I são verdadeiras para as duas primeiras. Contudo, a viabilidade do nematoide *P. superbus* não é alterada tanto no cenário de imersão por 24 h quanto na pós-reidratação.

6. Apêndices

APÊNDICE A. Decaimento β^- .

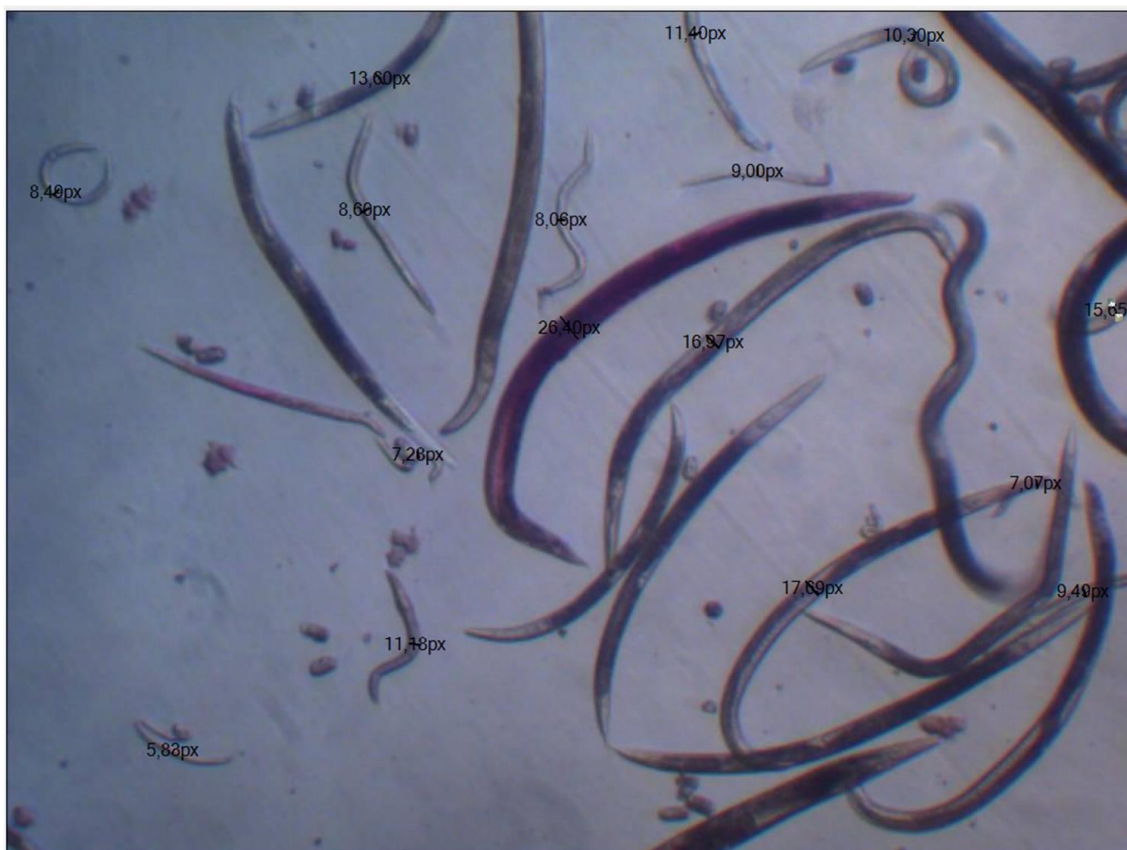
O aspecto chave que determina as propriedades e a natureza de um elemento químico é seu número atômico (Z), definido pelo número de prótons em seu núcleo. O número de massa (A) é a soma de seus prótons e nêutrons.

O isótopo trítio ($Z=1$, $A=3$) pode decair para hélio ($Z=2$, $A=3$) através do decaimento beta negativo (β^- decay). Isto é, um de seus nêutrons decai para um próton, com a emissão de um elétron e um elétron antineutrino.



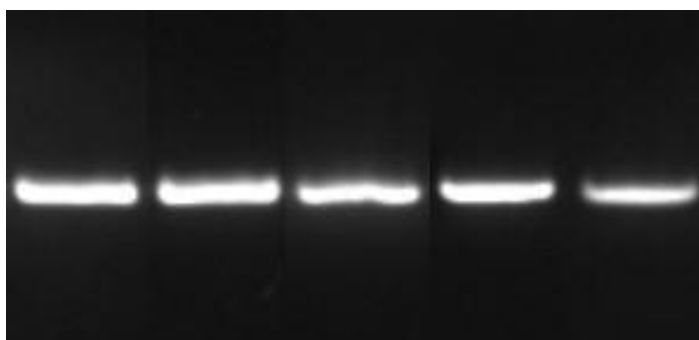
Nota. Diagrama de Feynman representado o decaimento β^- negativo. Um nêutron (n) decai em próton (p) com a emissão de um bóson W^- que posteriormente decai em um elétron (e^-) e um elétron antineutrino ($\bar{\nu}_e$). Em essência, um quark down (d) decai em quark up (u). t : tempo (Imagem retirada da internet).

APÊNDICE B. Imagem mostrando o procedimento de identificação de larvas L2 após o ensaio de viabilidade com Eritrosina B utilizando o programa ScopePhoto.



Nota: Larvas L2 possuem de 5,8 a 8,2 μm de espessura. Cada pixel (px) do programa possui cerca de 2 μm .

APÊNDICE C. Resultado da eletroforese com os produtos da PCR em D₂O.



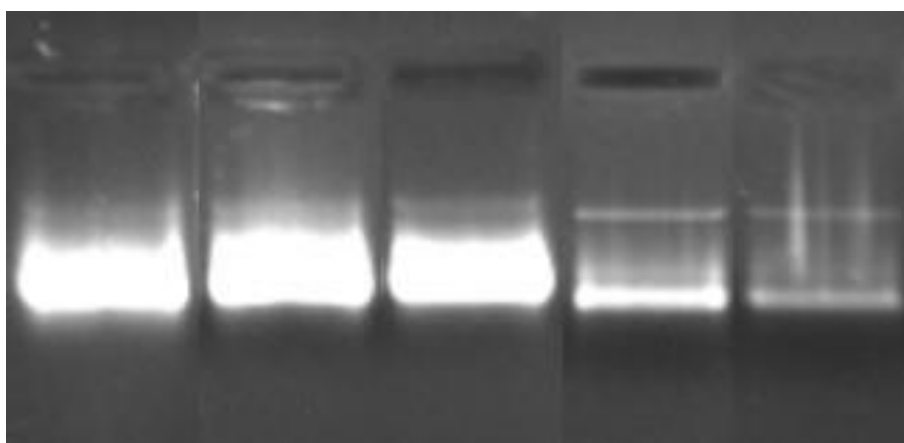
Nota: Da esquerda para a direita, as bandas correspondem a, respectivamente, PCR com H₂O; 15% D₂O; 30% D₂O; 45% D₂O e 60% D₂O. Cada raia é uma amostra representativa da triplicata técnica.

APÊNDICE D. Tubos de ensaio com o produto da transcrição *in vitro*.



Nota: Da esquerda para a direita, os tubos correspondem a, respectivamente: IVT em H₂O; 15% D₂O; 30% D₂O; 45% D₂O e 60% D₂O. Note a turbidez (opacidade, devido a produção de transcritos) dos três primeiros tubos em relação aos últimos dois.

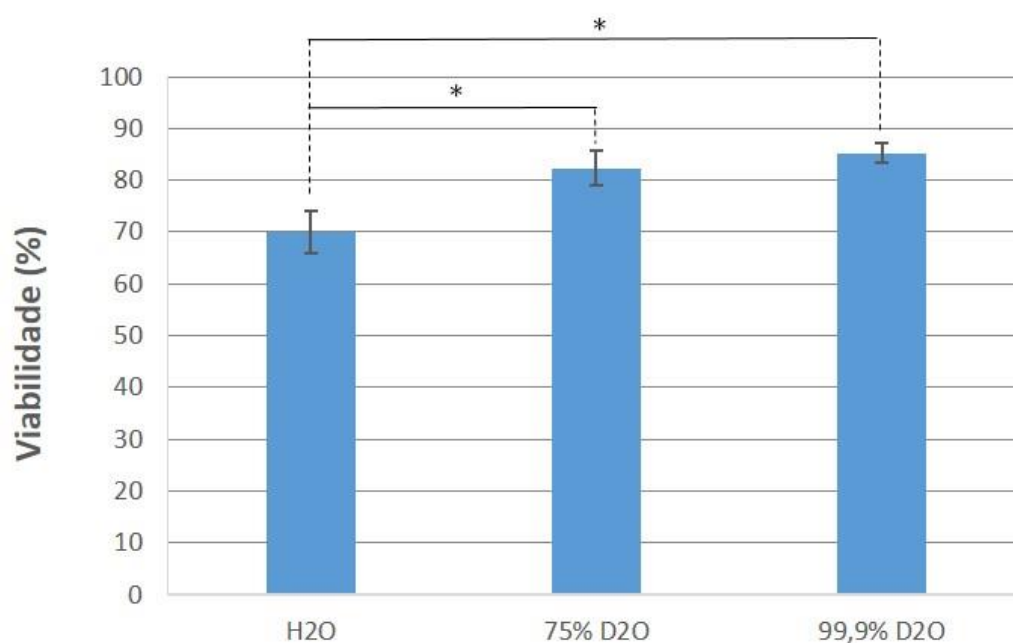
APÊNDICE E. Resultado da eletroforese dos produtos da transcrição *in vitro*



Nota: Da esquerda para a direita, as bandas correspondem a, respectivamente, IVT em H₂O; 15% D₂O; 30% D₂O; 45% D₂O e 60% D₂O. Cada raia é uma amostra representativa da triplicata técnica. Banda superior (mais fina): DNA molde para transcrição. Banda inferior (maior): produto da reação (transcrito).

APÊNDICE F *População mista imersa por 24 h em H₂O / D₂O*

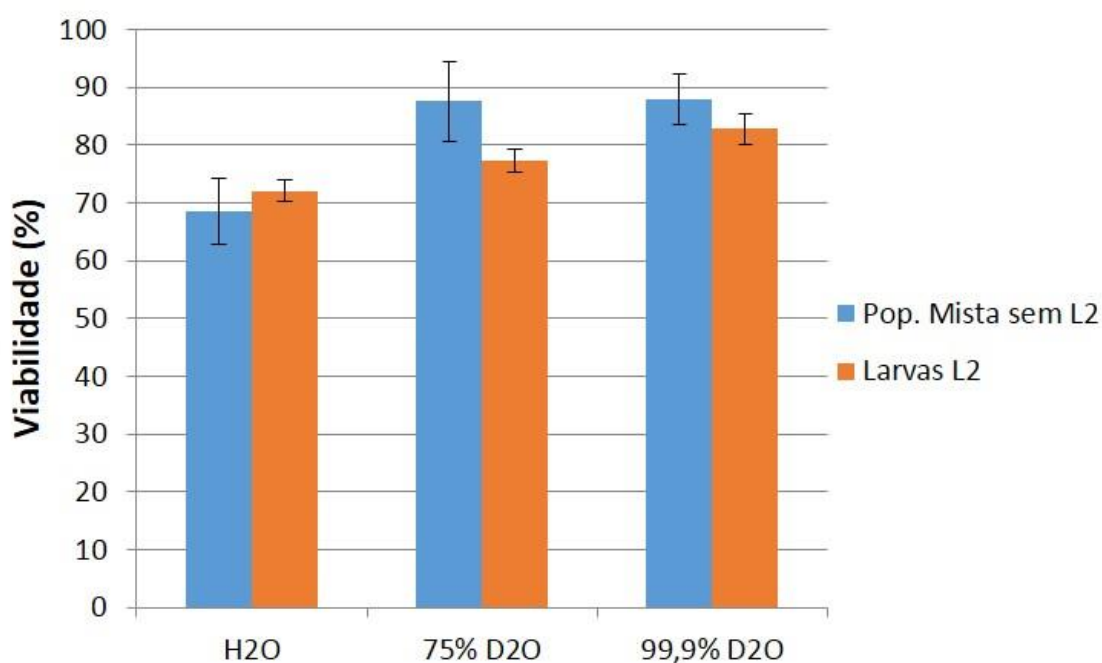
Os valores das médias e seus respectivos desvios-padrão do experimento de imersão de populações mistas de *P. superbis* em tampão M9 preparado com H₂O, 75% D₂O ou 99,9% D₂O estão apresentados a seguir.



Nota. Viabilidade de vermes (população mista) imersos por 24 h em tampão M9 diluído em diferentes concentrações de H₂O / D₂O. * $p < 0,05$ (ANOVA).

APÊNDICE G. Comparação da viabilidade após imersão por 24 h em H₂O / D₂O entre população mista (sem L2) versus larvas L2

Ainda foi comparado se a exposição ao óxido de deutério altera a viabilidade do grupo larval L2 em relação a população mista (indicado no apêndice E). Neste caso os dados de viabilidade da fase L2 foram subtraídos dos dados da população mista geral.



Nota. Viabilidade de vermes imersos por 24 h em tampão M9 diluído em diferentes concentrações de H₂O / D₂O. Comparação da população mista (desconsiderando larvas L2) com a fase larval L2. * $p < 0,05$ (Teste t de Student).

7. Referências Bibliográficas

Becquerel, P. **La suspension de la vie au dessous de 1/20 K absolu par demagnetization adiabatique de l'alun de fer dans le vide les plus élève.** *C. R. Hebd. Séance. Acad. Sci. Paris.* 231: 26, 1950

Burke, M. J. **The vitrous state and survival of anhydrous biological systems.** In *Membranes, metabolismo and dry organisms.* Ed A. C. Leopold. Ithaca, NY: Cornell University, pp. 358-364, 1986.

Cadwell, R. C.; Joyce, G. F. **Randomization of Genes by PCR Mutagenesis.** *PCR Methods Appl.* 2(1), 28-33, 1992.

Chellgren, B. W.; Creamer, T. P. **Effects of H₂O and D₂O on Polyproline II Helical Structure.** *Journal of American Chemistry Society*, 126, p. 14734-14734, 2004.

Chaplin, M. F. **Water: it's important to life.** *Biochemistry and Molecular Biology Education*, (29) pp 54-59, 2001

Clegg, J. S. **Biochemical adaptations associated with the embryonic dormancy of *Artemia salina*.** *Trans. Am. Microsc. Soc.* 93: 481-490, 1974.

Clegg, J. S. **Hydration dependent metabolic transitions and the state of water in *Artemia* cysts.** In. *Dry biological systems* (ed. J. H. Crowe e J. S. Clegg). *New York: Academic.* 117-154, 1978.

Clegg J. S. **Cryptobiosis: a peculiar state of biological organization.** *Comp. Biochem. Physiol.* 128B, 613-624, 2001.

Cleland, W. W. **The use of isotope effects to determine enzyme mechanisms,** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433, p. 2-12, 2005.

Copper, A. F., Van Gundy, S. D. **Senescence, quiescence, and cryptobiosis.** In *Plant parasitic nematodes.* (ed. B. M. Zuckerman, W. F. Mai, & R. A. Rohde). *New York. Academic Press.* 2: 297-318, 1971.

Crowe, J. H. **Anhydrobiosis: an unsolved problem.** *Am. Nat.* 105: 563-573, 1971.

Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., Crowe, L.M. **Anhydrobiosis.** *A. Rev. Physiol.* 54: 579-599, 1992.

De Ley, P., Blaxter M.L. **Systematic position and phylogeny.** In *The Biology of Nematodes.* (ed. D. Lee). *Harwood Academic Publishers.* 1-30, 2002.

Doyère, P. L. N. **Memories sur les tardigrades. Sur le facilité que possèdent lés tardigrades, les rotifers, les anguillules des toits et quelques autres of animalcules, de revenir à la vie après été complètement déssechées.** *Ann. Sci. Nat. (Ser. 2)* 18: 5, 1842.

Evangelista, C. C. S. **Estudo da participação de uma peroxiredoxina na via de anidrobiose através de interferência por RNA (RNAi).** 2011. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Farver, O.; Zhang, J.; Chi, Q.; Pecht, I.; Ulstrup, J. **Deuterium Isotope effect on intramolecular electron transfer in *Pseudomonas aeruginosa* azurin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 8, p. 4426-4430, 2001.

Ford, B. J. **The van Leewenhoek Specimens.** *Notes and Records of the Royal Society of London*. Vol 36: No 1, pp 37-59, 1981.

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

Garcia de Castro, A., Bredholt, H., Strom, A.R., Tunnacliffe A. **Anhydrobiotic engineering of gram-negative bacteria.** *Appl Environ Microbiol*. 66 (9): 4142-4, 2000.

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

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

Goryunov, A. S. **H/D Isotope Effects on Protein Hydration and Interaction in Solution.** *General Physiology and Biophysics*, 25, p. 303-311, 2006.

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

Guidetti, R., Jönsson, K. I. **Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans.** *J.Zool*. 257: 181-187, 2002.

Hammel, S. C.; East, K.; Shaka, A. J.; Rose, M. R.; Shahrestani, P. **Brief Early-Life Non-Specific Incorporation of Deuterium Extends Mean Life Span in *Drosophila melanogaster* Without Affecting Fecundity.** *Rejuvenation Research*, 16, 2, p. 98-104, 2013.

Hardie, D. C.; Gregory, R.; Hebert, P. D. N. **From Pixels to Picograms: A Beginners' Guide to Genome Quantification by Feulgen Image Analysis Densitometry.** *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 60(6): 735-749, 2002.

Harrison, J. **Doses and risks from tritiated water and environmental organically bound tritium.** *Journal of Radiological Protection*. 29: 335 – 349, 2009.

Hinton, H. E. **A fly larva that tolerates dehydration and temperatures of - 270°C to +102°C.** *Nature*. 188: 333-337, 1960.

Hirai, K.; Tomida, M.; Kikuchi, Y.; Ueda, O.; Ando, H.; Asanuma, N. **Effects of Deuterium Oxide on *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa*.** *Bull Tokyo Dent Coll*, 51, 4, p. 175-183, 2010.

Hohlefelder, L. S.; Stögbauer, T.; Opitz, M.; Bayerl, T. M.; Rädler, J. O. **Heavy Water Reduces GFP Expression in Prokaryotic Cell-Free Assays at the Translation Level While Stimulating Its Transcription.** *BioMed Research International*, 2013, p. 1-9, 2013.

- Hughes, A. M.; Hildebrath, P. E.; Becker, G. C. **Genetic effects of deuterium oxide in *Drosophila melanogaster***. *Genetic*, 49, p. 715-7124, 1964.
- Jönsson, K. I. **The evolution of life histories in holo-anhydrobiotic animals: a first approach**. *Integr. Comp. Biol.* 45: 764-770, 2005.
- Kang, S. A.; Hoke, K. R.; Crane, B. C. **Solvent Isotope Effects on Interfacial Protein Electron Transfer in Crystals and Electrode Films**, *Journal American Chemistry Society*, 128, p. 2346-2355, 2006.
- Katz, J. J. **Chemical and Biological Studies with Deuterium**. *American Scientist*, 48, 4, p.544-580, 1960.
- Katz, J. J., Crespi, H. L., Czajka, D. M., Finkel, A. J. **Course of deuteration and some physiological effects of deuterium in mice**. *American Journal of Physiology*. 203: 907-913, 1962.
- Kaufman, S., Libby, W. F. **The natural distribution of Tritium**. *Physycal Review*. Vol 93, No 6 pp 1337-1344, 1954.
- Keilin, D. **The problem of anabiosis or latent life: history and current concept**. *Proc. R. Soc. Lond.* B 150 (939), 149-191, 1959.
- Kirkina, A. A.; Lobyshev, V. I.; Lopina, O. D.; Doronin, Y. K.; Burdeinaya, T. N.; Chernopyatko, A. S. **Isotopic Effects of Low Concentration of Deuterium in Water on Biological Systems**, *Biophysics*, 59, 2, p. 326-333, 2014.
- Kushner, D. J.; Baker, A.; Dunstall, T. G. **Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds**, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 77, p. 79-88, 1999.
- Lapinski, J., Tunnaclyffe, A. **Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers**. *FEBS Lett.* 553 (3): 387-90, 2003.
- Marcus, E. **Targidrada**. *Bronn's Klassen und Ordnungem des Tierreichs*, 5: 1- 608, 1929.
- Mattimore V.; Battista, J. R. **Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radioation are also necessary to survive prolonged desiccation**, *Journal of Bacteriology*, 178, p. 633-637, 1996.
- Minamoto, T; Wada, E.; Shimizu, I. **A new method for random mutagenesis by error-prone polymerase chain reaction using heavy water**. *Journal of Biotechnology*, 157, p. 71-74, 2012.
- Müller, H., Achilles-Day, U. E. M., Day, H. G. **Tolerance of resting cysts of *Colpoda inflata* (Ciliophora, Colpodea) and *Meseres corlissi* (Ciliophora Spirotrichea) to desiccation and freezing**. *Europenean Journal of Prostiliology*, (46) 133-142, 2010.
- Oliver, M. J., Tuba, Z., Mishler, B. D. **The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants**. *Pl. Ecol.* 15: 85-100, 2000.
- Ooms J. J. J., León-Kloosterziel K. M., Bartels D., Koornneef M. & Karssen C. M. (1993). **Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana***. *Pl. Physiol.* 102, 1185-1191, 1993.

- Rahm, G. **Biologische und physiologische Beiträge zur Kenntnis der Moosfauna.** *Z. Allg. Physiol.* 20: 1-34, 1923.
- Rahm, G. **A new ordo of tardigrades from the hot springs of Japan (Furuyu section, Unzen).** *Annot. Zool. Jpn.* 16: 345-352, 1937.
- Ramazzotti, G. **Il phylum tardigrada.** *Mem. Instituto Ital. Idrobiol.* 14: 1-595, 1962.
- Reardon, W., Chakrabortee, S., Pereira, T. C., Tyson, T., Banton, M. C., Dolan, K. M., Culleton, B. A., Wise, M. J., Burnell, A. M., Tunnacliffe A. **Expression profiling and cross-species RNA interference (RNAi) of desiccation-induced transcripts in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*.** *BMC Molecular Biology.* 11: 6, 2010.
- Samis, H. V.; Baird, M. B.; Massie, H. R. **Deuterium Oxide Effect on Temperature-Dependent Survival in Populations of *Drosophila melanogaster*.** *Science.* 183 (4123), p. 427=428, 1974.
- 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.* 105(13):5093-8, 2008.
- Schebor, C., Galvagno, M., Buera, M. P., Chirife, J. **Glass transition temperatures and fermentative activity of heat-treated commercial active dry yeasts.** *Biotechnology Progress.* 16 (2): 163-168, 2000.
- Schmidt, P. **Anabiosis.** *USSR Acad. Sci. Moscow and Lenigrad.* [In Russian.], 376, 1948.
- Seki, K., Toyoshima, M. **Preserving tardigrades under pressure.** *Nature.* 395: 853-854, 1998.
- 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).** *J Exp Biol.* 208: 2433-45, 2005.
- Shen, M. J., Mudgett, M. B., Schopf, J. W., Clarke, S., Berger, R. **Exceptional seed longevity and robust growth: ancient sacred lotus from China.** *Am. J. Bot.* 82: 1367-1380, 1995.
- 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: 1434-7, 2004.
- Steiner, G., Albin, F. E. **Resuscitation of the nematode *Tylenchis polyhyphnus* sp., after almost 39 years' dormancy.** *J. Wash. Acad. Sci.* 36: 97-99, 1946.
- Stryer, L. **Biochemistry.** *New York: Freeman,* 1999.
- Sussman, A. S., Halvorson, H. O. **Spores: their dormancy and germination.** *Haper & Row. New York and London.* 354, 1966.
- Takeda, M., Miyanoiri, Y., Terauchi, T., Yang, C., Kainosho, M. (2014). **Use of H/D isotope effects to gather information about hydrogen bonding and hydrogen exchange rates.** *Journal of Magnetical Resonance* 241: 148-154, 2014.
- Thomson, J. F. **Physiological effects of D2O in mammals.** *Annals of the New York Academy Sciences.* 84: 736-744, 1960.
- Tunnacliffe, A.; Lapinski J. **Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of dissacharides in anhydrobiosis,** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences,* 358, 1438, p. 1755-1771, 2003.

- Tyson, T., Zamora, G. O., Wong, S., Skelton M., Daly B., Jones, J. T., Mulvihill, E. D., Elsworth, B., Phillips, M., Blaxter, M., Burnell, A. M. **A molecular analysis of desiccation tolerance mechanisms in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus* using expressed sequence tags.** *BMC Research Notes*. 5:68, 2012.
- Urey, H. C., Brickwedde, F. G., Murphy, G. M. **A hydrogen isotope of mass 2 and its concentration.** *Phys. Rev.* 40, 1.
- Van Gundy, S. D. **Factors in survival of nematodes.** *Ann. Rev. Phytopathol.* 3: 43-68, 1965.
- Vegis, A. **Dormancy in higher plants.** *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 15: 185-225, 1964.
- Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D., Powers, D. W. **Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal.** *Nature*. 407: 897-900, 2000.
- Watanabe, M. **Anhydrobiosis in invertebrates.** *Appl. Entomol. Zool.* 41 (1): 15-31, 2006.
- Wilson C. G., Sherman P. W. **Anciently asexual bdelloid rotifers escape lethal fungal parasites by drying up and blowing away.** *Science*. 327(5965):574-6, 2010.
- Womersley, C. and Smith, L. **Anhydrobiosis in nematodes. 1. The role of glycerol, myoinositol and trehalose during desiccation.** *Comp. Biochem. Physiol.* 70B, 579-586, 1981.
- Womersley, C. Z. **A reevaluation of strategies employed by nematode anhydrobiotes in relation to their natural environment.** In *Vistas on Nematology*. (ed. J. Veech and D. W. Dickson). 165-173, 1987.