

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

DANIELA TREMEA CASALI

**PROGESTERONA, ESTRÓGENOS E ANDRÓGENOS EM PLANTAS, UMA
REVISÃO CRÍTICA E EVOLUÇÃO MOLECULAR DO RECEPTOR DE
PROGESTERONA ASSOCIADO À MEMBRANA (MAPR) EM PLANTAS, UM
ESTUDO INICIAL**

PORTO ALEGRE

2021

DANIELA TREMEA CASALI

**PROGESTERONA, ESTRÓGENOS E ANDRÓGENOS EM PLANTAS, UMA
REVISÃO CRÍTICA E EVOLUÇÃO MOLECULAR DO RECEPTOR DE
PROGESTERONA ASSOCIADO À MEMBRANA (MAPR) EM PLANTAS, UM
ESTUDO INICIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Luiz Gonçalves Soares.

Coorientadora: Profa. Dra. Caroline Turchetto.

PORTO ALEGRE

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Reitor: Carlos André Bulhões Mendes

Vice-Reitora: Patrícia Helena Lucas Pranke

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

Diretora: Clarice Bernhardt Fialho

Vice-diretora: Luiz Roberto Malabarba

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Coordenadora: Loreta Brandão de Freitas

Coordenadora Substituta: Alice Pita Barbosa

CIP - Catalogação na Publicação

Casali, Daniela Tremea

Progesteronas, estrógenos e andrógenos em plantas, uma revisão crítica e evolução molecular do receptor de progesterona associado à membrana (mapr) em plantas / Daniela Tremea Casali. -- 2021.

71 f.

Orientador: Geraldo Luiz Gonçalves Soares.

Coorientadora: Caroline Turchetto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Progesteronas em Plantas. 2. Estrógenos em Plantas. 3. Andrógenos em Plantas. I. Soares, Geraldo Luiz Gonçalves, orient. II. Turchetto, Caroline, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DANIELA TREMEA CASALI

**PROGESTERONA, ESTRÓGENOS E ANDRÓGENOS EM PLANTAS, UMA
REVISÃO CRÍTICA E EVOLUÇÃO MOLECULAR DO RECEPTOR DE
PROGESTERONA ASSOCIADO À MEMBRANA (MAPR) EM PLANTAS, UM
ESTUDO INICIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Aprovado em: 29 /10/2021.

Prof. Dr. Geraldo Luiz Gonçalves Soares (Orientador)

Doutor em Ciências

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Caroline Turchetto

Doutora em Ciências - Genética e Biologia Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Regina Pinto Lima

Doutora em Ciências - Genética

Universidade Rural do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Andreia Carina Turchetto Zolet

Doutora em Ciências - Genética e Biologia Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Tatiana Teixeira de Souza Chies

Doutora em em Ciências da Vida - Biologia Vegetal .

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Este trabalho de pesquisa só foi realizado graças ao apoio e financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGBot).

RESUMO

Este trabalho de pesquisa se dedicou ao estudo de esteroides estrógenos, andrógenos e progesterona em organismos vegetais. Divide-se em dois capítulos nos quais é apresentado o desenvolvimento da pesquisa. No primeiro capítulo, além de sintetizar informações de ação fisiológica e rota biossintética em uma revisão bibliográfica, o objetivo foi traçar um panorama sobre a presença destes esteroides em plantas, a partir dos dados disponíveis de pesquisas que utilizaram metodologias de detecção e identificação química destas substâncias. No segundo capítulo, estudamos genes que codificam uma família de proteínas de ligação a esteroides (MAPR), descritas para diversos eucariotos e presente em plantas, com objetivo de traçar um panorama evolutivo desta família gênica nos clados vegetais e levantar pistas de sua natureza funcional. A partir das estratégias de revisão bibliográfica empregadas, foi possível reunir informações sobre a importância destes esteroides no desenvolvimento primário e reprodutivo de plantas, além da sua influência no metabolismo de tolerância às condições de estresse abiótico destes organismos. Dentro dos limites de abrangência taxonômica dos dados de detecção e identificação coletados, progesterona, estrógenos e andrógenos parecem estar presentes em grande parte das angiospermas (Magnoliophyta) e há indícios de que possa estar presentes em outros grupos de plantas terrestres como Monilophyta e Pinophyta. Se considerarmos as proteínas de ligação MAPR de plantas como indicadores da presença e sinalização endógena de esteroides, além de endossar a sua ocorrência nos clados já citados, evidencia, também, a presença destes esteroides nas plantas terrestres a partir de Marchantiophyta e Bryophyta. Os resultados das reconstruções filogenéticas revelam que entre as homologias desta família gênica, há divergências exclusivas dentro dos clados de plantas verdes. Três agrupamentos foram revelados nas MAPR de Viridiplantae (Grupo A1 e A2 e Grupo B) e a distribuição no número de cópias foi diferente entre clados distintos. A natureza bem conservada das sequências de aminoácidos desta família gênica e pouco acúmulo de variações e pode indicar uma forte pressão seletiva para a manutenção dos domínios e, possivelmente, das funções dependentes destes domínios conservados. Este trabalho, no intuito de contribuir para o estudo destas substâncias em plantas, oferece uma visão inicial, mais geral, para que possamos traçar hipóteses para novos estudos, necessários para compreender melhor o papel destas proteínas MAPR em plantas e sua relação com as funções fisiológicas da progesterona e outros esteroides nestes organismos.

Palavras-chave: Fisiologia Vegetal, Fitoesteroides, Hormônios Esteróides, MAPR, MSBP

ABSTRACT

This research effort was focused on studying estrogen, androgen and progesterone steroids in plant organisms. It is divided into two chapters in which are presented the development of the research. The objective of the first chapter was to synthesize information about the physiological action and biosynthetic pathways of these steroids in plants, and to provide an overview of the presence of these steroids in plants from the available research data on chemical detection and identification for these substances on plant tissues. In the second chapter, we study genes encoding a family of steroid-binding proteins (MAPRs), described for several eukaryotes and present in plants, in order to draw an evolutionary picture of this gene family in plant clades and to raise clues to its functional nature. From the literature review strategies employed, it was possible to gather information about the importance of these steroids on the primary and reproductive development of plants, in addition to their influence on abiotic stress tolerance metabolism. Within the taxonomic range of the detection and identification data collected, progesterone, estrogens and androgens, appear to be present in most angiosperms (Magnoliophyta) and there is evidence that they might be present in other terrestrial plant groups such as Monilophyta and Pinophyta. If we consider plant MAPR proteins as indicators of the presence and endogenous signaling of steroids, besides endorsing this occurrence in the clades already mentioned, it would also evidence their presence in land plants from Marchantiophyta and Bryophyta. The results of phylogenetic reconstructions revealed deep homology among the proteins in this gene family, our results corroborated previous findings for the evolution of this family and also highlighted unique divergences within the green plant clades. Three clusters were found in Viridiplantae MAPRs (Group A1 and A2 and Group B) and the distribution of copy numbers was different between distinct clades. The low support of some tree branches and polytomies resulting from our phylogenetic reconstructions highlight the well-conserved nature of the amino acid sequences of this gene family. This low maintenance of mutations may indicate selective pressure to maintain the domains and possibly the functions dependent on these conserved domains. This work, in order to contribute to the study of these substances in plants, provides an initial overview so that we can draw hypotheses for further studies, necessary to better understand the role of these MAPR proteins in plants and their relationship to the physiological functions of progesterone and other steroids in these organisms.

Keywords: Plant Physiology, Phytosteroids, Steroid Hormones, MAPR, MSBP

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	7
1. PROGESTERONAS, ESTRÓGENOS E ANDRÓGENOS EM PLANTAS, UMA REVISÃO CRÍTICA.....	10
1.1 INTRODUÇÃO.....	10
1.2 METODOLOGIA.....	11
<i>1.2.1 Levantamento bibliográfico.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.2 Banco de dados.....</i>	<i>12</i>
<i>1.2.3 Categorização dos resultados para fins de análise:.....</i>	<i>13</i>
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
<i>1.3.1 Progesterona e seus Derivados em Plantas.....</i>	<i>14</i>
<i>1.3.2 Biossíntese de esteroides em plantas.....</i>	<i>16</i>
<i>1.3.3 Ação dos esteroides no desenvolvimento primário e reprodutivo em plantas.....</i>	<i>22</i>
1.3.4 Relação de esteroides com a tolerância a condições de estresse abiótico em plantas.....	23
<i>1.3.5 Banco de Dados.....</i>	<i>24</i>
<i>Progesterona.....</i>	<i>26</i>
<i>Andrógenos.....</i>	<i>28</i>
<i>Estrógenos.....</i>	<i>30</i>
1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
1.5 REFERÊNCIAS.....	32
Informação Suplementar I: Estratégias de busca detalhadas.....	37
2. EVOLUÇÃO MOLECULAR DO RECEPTOR DE PROGESTERONA ASSOCIADO À MEMBRANA (MAPR) EM PLANTAS, UM ESTUDO INICIAL.....	38
Figuras:.....	38
Tabelas:.....	39
Material Suplementar:.....	39
Lista de siglas:.....	40

2.1 INTRODUÇÃO.....	40
<i>Pregnanos, alopregnanos e estranos em plantas.....</i>	40
<i>Receptores e proteínas de ligação.....</i>	43
<i>MAPR em Viridiplantae.....</i>	44
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.2.1 Obtenção dos dados.....	46
2.2.2 Tratamento, análise e alinhamento múltiplo de sequências.....	49
2.2.3 Seleção de modelo evolutivo e reconstrução filogenética.....	49
2.3 RESULTADOS.....	50
2.3.1 Identificação de genes MAPR em diferentes linhagens de plantas.....	50
2.3.2 Análise filogenética das proteínas MAPR.....	51
2.4 DISCUSSÃO.....	56
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
2.6 REFERÊNCIAS.....	59
Material Suplementar 1: Sequências de homólogos de organismos <i>Viridiplantae</i> utilizadas nas análises resgatadas das bases de dados <i>Phytozome</i> e <i>EnsemblPlants</i>:.....	63
Material Suplementar 2: Sequências de homólogos de organismos <i>Opisthokonta</i> utilizadas nas análises resgatadas das bases de dados <i>EnsemblFungi</i> e <i>EnsemblMetazoa</i>.	66
Material Suplementar 3: Reconstrução filogenética das proteínas MAPR em diferentes <i>Viridiplantae</i> e <i>Opisthokonta</i>.....	68
Material Suplementar 4: Árvores Radiais.....	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71

INTRODUÇÃO GERAL

A história da humanidade sempre esteve intimamente vinculada a matérias primas botânicas. Além de estar presente nas ferramentas, vestuário e de constituir a base da nossa alimentação, durante muitos séculos os vegetais integraram as bases da medicina com ampla aplicação no tratamento de doenças e enfermidades. O uso das plantas foi considerado de tal importância para as civilizações a ponto de ser transmitido de geração em geração e constituir parte essencial da cultura e conhecimentos da humanidade. Os fundamentos e práticas do emprego das plantas conforme os usos de cada lugar e culturas está documentado em diversos textos históricos desde os seus primeiros registros na Mesopotâmia, China, Índia e Egito (Aboelsoud, 2010; David, Wolfender e Dias, 2015) e bem descritos nos textos antigos de Hipócrates e Teofrasto.

O interesse científico pelos potenciais das diversas plantas tradicionalmente utilizadas para tratar sintomas ligados ao metabolismo hormonal foi impulsionado pelos avanços na área da saúde. Por meados dos anos 1960, houve uma busca por fontes destas substâncias com foco na reposição e tratamento hormonal, em especial por parte da indústria farmacêutica, que recém começara a fabricar e comercializar anticoncepcionais em larga escala (Preciado, 2008). O interesse comercial dos hormônios esteroides, em especial os estrógenos, andrógenos e progesteronas, fomentou a procura por fontes de obtenção destas substâncias, e não só levaram à descoberta em plantas de substâncias análogas aos hormônios esteroides de mamíferos, os agonistas (Fig. 1 a) chamados de “fitoestrógenos”(Setchell e Cassidy, 1999; Desmawati e Sulastri, 2019), como também à descrição da presença de substâncias “idênticas aos hormônios esteroides animais” nos organismos vegetais (Fig. 1 b).

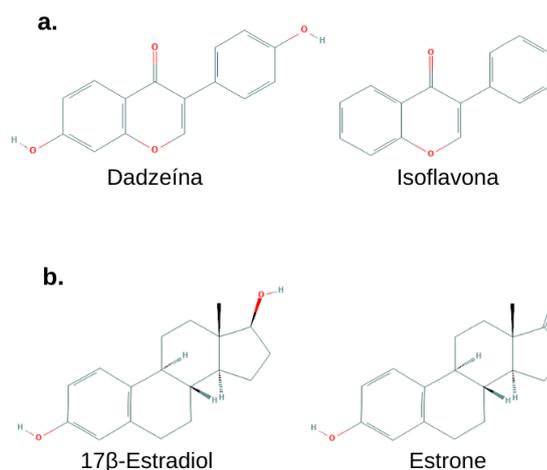


Figura 1: a. Estrutura de fitoesteróides estrogênio-agonistas. b. Estruturas de hormônios esteróides estrógenos. Fonte: PubChem.

Além do interesse na utilização destas plantas para reposição hormonal ou na complementação de terapias hormonais, tem se discutido os possíveis efeitos da presença destas substâncias nas espécies de uso cotidiano nutricional e medicinal. Mesmo em baixas concentrações, estes hormônios esteroides têm potencial de desencadear respostas sistêmicas em nosso organismo, logo, a importância de reconhecer a presença destes na dieta para um consumo mais seguro e informado. Diversas pesquisas buscaram compreender a presença e atuação destes esteroides em organismos vegetais (Young, Knights e Hillman, 1977; Simons e Greenwich, 1989) e, com o aprimoramento das técnicas e metodologias experimentais, outros trabalhos relataram resultados que corroboram com a presença destes esteroides em plantas (Iino *et al.*, 2007; Kadam, Barnabas e Gaykar, 2017; Waman, Bohra e Sounderarajan, 2018). Apesar dos avanços, os mecanismos de biossíntese e as influências destes na fisiologia vegetal ainda não estão bem desvendados (Tarkowská, 2019).

No intuito de sanar algumas destas questões, este trabalho de pesquisa se dedicou ao estudo de esteroides estrógenos, andrógenos e progesterona encontrados em diversos organismos eucariontes, desde seres unicelulares a vertebrados e fungos. Mais recentemente vem se confirmando sua presença em plantas, destacando-se o número de ocorrências entre as angiospermas. O trabalho se divide em dois capítulos nos quais é apresentado o desenvolvimento da pesquisa. No primeiro capítulo, além de sintetizar informações de ação fisiológica e rota biossintética em uma revisão bibliográfica, o objetivo foi traçar um panorama sobre a presença destes esteroides em plantas, a partir dos dados disponíveis de pesquisas que utilizaram metodologias de detecção e identificação química destas substâncias.

No segundo capítulo, estudamos genes que codificam uma família de proteínas de ligação a esteroides, descritas para diversos eucariotos, em especial vertebrados, e presente em plantas, com objetivo de traçar um panorama evolutivo desta família gênica nos clados vegetais e levantar pistas de sua natureza funcional.

O primeiro capítulo desta dissertação, na forma de uma revisão, aborda a presença de progesterona e esteroides derivados e a rota de biossíntese destas substâncias em organismos vegetais. O texto segue para uma síntese de trabalhos que estudaram os efeitos destes esteroides na fisiologia de organismos vegetais. Na descrição metodológica se encontram as estratégias de busca booleana e de padronização dos dados. A partir de informações inventariadas referentes à presença de estrógenos, progesteronas e andrógenos em tecidos vegetais, montamos um banco de dados com as informações levantadas, a fim de analisar os padrões de ocorrência relacionado aos táxons botânicos e órgãos vegetais.

Ao encontro de algumas questões levantadas durante os esforços de pesquisa, o segundo capítulo se dedica a fazer uma reconstrução filogenética dos genes da família de proteínas MAPR em plantas, das poucas candidatas conhecidas em plantas terrestres para receptor de progesterona. Na introdução deste segundo capítulo, há um resumo sobre pregnanos e derivados, a resposta dos receptores destes esteroides a fatores ambientais, os trabalhos que descrevem esta família de proteínas e alguns estudos evolutivos sobre esta família gênica. Presentes em diversos organismos eucariontes, três genes MAPR ancestrais que originaram os homólogos PGRMC (*progesterone receptor membrane component*), Neuferricina (NENF) e Neudesina (NEUFC), foram identificados para opistocontes, entretanto, há poucos estudos de abordagem evolutiva sobre esta família no reino vegetal.

A partir de uma isca selecionada MAPR descrita para *A. thaliana*, foi realizado um BLASTp nas bases de dados *Phytozome* e *Ensembl* contra os genomas de espécies representantes de algas vermelhas e de clados das Viridiplantae e Opistocontae. Na descrição metodológica se encontram os detalhes do tratamento e análise dos dados.

1. PROGESTERONA, ESTRÓGENOS E ANDRÓGENOS EM PLANTAS, UMA REVISÃO CRÍTICA

RESUMO

Estrógenos, andrógenos e progesterona são esteroides encontrados em diversos organismos eucariontes, desde seres unicelulares a vertebrados, fungos e mais recentemente vem se confirmando sua presença em plantas, destacando-se o número de ocorrências entre as angiospermas. Uma revisão bibliográfica da literatura acadêmica foi realizada a partir de estratégias de busca booleana. A partir das evidências reunidas, geradas em diversas décadas de estudo, vem se desvendando pistas da sua participação na regulação de diversos processos fisiológicos de desenvolvimento e adaptação em organismos vegetais. Foram analisados um total de 72 artigos dentro do escopo da investigação. A partir dos trabalhos encontrados, foi possível categorizá-los em quatro grupos, de acordo com as metodologias empregadas: Aplicação Exógena (35), Detecção e Identificação (25), Revisão de literatura (9), Outras metodologias (3). Um banco de dados foi desenvolvido a partir do resultado de 25 artigos de detecção e identificação de andrógenos, estrógenos e progesterona em tecidos vegetais. Os resultados de presença (positiva ou negativa) refletiram o esforço de amostragem, sendo as famílias Asteraceae, Fabaceae, Poaceae e Rosaceae as famílias mais amostradas e com maior número destes esteroides identificados em seus tecidos. Ademais, progesterona, estrógenos e andrógenos parecem estar presentes em grande parte das angiospermas (Magnoliophyta) e encontramos indícios que também possa estar presentes em outros grupos de plantas terrestres como Monilophyta e Pinophyta. Em relação aos órgãos vegetais, diferenças significativas nas médias de identificações de andrógenos sugerem que possa haver maior probabilidade de encontrar estes esteroides em tecidos florais do que nos tecidos do caule, além disso, progesterona, estrógenos e andrógenos parecem estar presentes em todos os tecidos estudados. A partir dos dados levantados na revisão bibliográfica, um esquema biossintético simples foi montado. Apesar de os estudos nesse sentido terem avançado bastante, ainda há grandes lacunas no conhecimento do metabolismo, presença e funções destas substâncias em organismos vegetais.

ABSTRACT

Estrogen, androgen, and progesterone steroids are widespread in eukaryotic organisms, from unicellular organisms to vertebrates and fungi, and their presence in plants has recently been confirmed, especially in angiosperms. A literature review of academic literature was carried out using Boolean search strategy. From the evidence gathered, generated in several decades of study, clues of its participation in the regulation of several physiological processes of development and adaptation in plant organisms have been unveiled. A total of 72 articles within the scope of the investigation were analyzed, and it was possible to categorize them into four groups, according to the methodologies used: Exogenous Application (35), Detection and Identification (25), Literature review (9), Other methodologies (3). A database was developed from 25 articles on detection and identification of androgens, estrogens and progesterone in plant tissues. Presence results (positive or negative) reflected the sampling effort, Asteraceae, Fabaceae, Poaceae and Rosaceae families being the most sampled families and with the highest number of these steroids identified in their tissues. Furthermore, progesterone, estrogens and androgens seem to be present in large part of the angiosperms (Magnoliophytas), and we found evidence that they may also be present in other groups of land plants such as Monilophytas and Pinophytas. Regarding plant organs, significant differences in the means of androgen identifications suggest that there may be a greater probability of finding these steroids in floral tissues than in stem tissues. In addition, progesterone, estrogens and androgens seem to be present in all tissues studied. From the data collected in the literature review, a simple biosynthetic scheme was created. Although studies in this regard have advanced a lot, there are still significant gaps in the knowledge regarding metabolism, presence and functions of these substances in plants.

1.1 INTRODUÇÃO

A história da humanidade sempre esteve intimamente ligada aos materiais de base botânica. Além de estar presente em ferramentas, roupas e ser a base da dieta humana, durante muitos séculos os vegetais integraram as bases da medicina com vasta aplicação no tratamento de doenças e enfermidades. Várias plantas tradicionalmente usadas para tratar sintomas ligados ao metabolismo de hormônios esteroides em humanos têm sido alvo de

muitos cientistas devido a seus potenciais usos para induzir traços e tratar sintomas ligados ao metabolismo hormonal. O interesse comercial pelos hormônios esteroides, em particular estrogênios, andrógenos e progesterona, fomentou a busca de fontes vegetais para estas substâncias, e não apenas levou à descoberta de análogos aos hormônios esteroides de mamíferos, os agonistas (Fig. 1a) chamados " fitoestrógenos" (Setchell e Cassidy, 1999; Desmawati e Sulastri, 2019), bem como a detecção de substâncias "idênticas aos hormônios esteroides animais" em organismos vegetais (Fig. 1b).

Além do interesse no uso medicinal e terapêutico, temos o debate sobre a possível presença dessas substâncias em espécies de uso nutricional e medicinal diários. Mesmo em baixas concentrações, estes hormônios esteroides têm potencial para desencadear respostas sistêmicas em nosso organismo. Portanto, é essencial reconhecer sua presença em espécies vegetais para um consumo mais seguro e bem informado. Vários estudos têm tentado entender a presença e ação destes esteroides em plantas (Young, Knights e Hillman, 1977; Simons e Grinwich, 1989), e com o desenvolvimento de melhores métodos e técnicas experimentais, os resultados dos estudos mais recentes corroboram a presença destes esteroides em várias espécies vegetais, especialmente em angiospermas (Iino et al., 2007; Kadam, Barnabas e Gaykar, 2017; Waman, Bohra e Sounderarajan, 2018). Apesar dos avanços, os mecanismos de biossíntese e as influências destes esteroides na fisiologia vegetal ainda não foram totalmente desvendados (Tarkowská, 2019).

Esta revisão procurou abordar algumas questões sobre a natureza da presença, distribuição e fisiologia dessas substâncias nas plantas: quão abrangente (taxonomicamente) é a informação que temos sobre a presença desses esteroides até agora; em quais órgãos eles são encontrados; e se há diferenças na presença dessas substâncias entre clados. Com base nestas questões, este estudo reuniu informações sobre a presença de estrogênios, progesteronas e andrógenos em tecidos vegetais para montar um banco de dados a fim de analisar os padrões de ocorrência relacionados à táxons botânicos e tecidos vegetais. A partir dos artigos encontrados no âmbito do estudo, também foi possível organizar uma revisão bibliográfica dos trabalhos acadêmicos publicados até 2020 e organizar esquematicamente o conhecimento atual da via biossintética.

1.2 METODOLOGIA

1.2.1 Levantamento bibliográfico

A metodologia consistiu em uma busca, a partir de parâmetros preestabelecidos com base em Cooper e colaboradores (Cooper *et al.* 2018), das ocorrências de estrógenos, andrógenos e progesteronas em plantas. Foram utilizadas as bases de dados *Scopus* (scopus.com), *ISI Web of Science* (isiknowledge.com), *NCBI* (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) e no programa de referências *Mendeley*, com técnicas de busca booleana através da combinação dos termos e palavras-chave: “*Plants, Plant, Steroid Hormone, Steroid, Phytosteroid associados a Estrone, Estrogen, Estranes, Estradiol, Progesterone, Testosterone, Androsterone, Androgens, Androgen, Androstenedione*”. As palavras-chave foram elaboradas

com base em revisões sobre o assunto e refinadas de acordo com o dicionário de sinônimos de vocabulário controlado, *Medical Subject Headings* (ncbi.nlm.nih.gov/mesh/) combinado com a base de dados *The Gene Ontology* (geneontology.org/). Para compor o banco de dados da presença destas substâncias nas plantas, foram selecionados artigos publicados no período de 1950-2020, que tenham utilizado algum tipo de detecção e identificação de esteroides em plantas, disponíveis em inglês ou em versão digital, com resultados claramente apresentados. Os detalhes da elaboração das estratégias de busca e palavras-chave estão disponíveis nas informações suplementares (Informação Suplementar I).

1.2.2 Banco de dados

Dos artigos encontrados foram extraídas as informações: nome da espécie; esteroides presentes na amostra; técnica de detecção; autor, ano de publicação; país de origem. Cada teste de esteroide (progesterona, estrógeno ou andrógeno) realizado em um órgão vegetal constituiu uma unidade amostral (UA). Os nomes das espécies foram conferidos e atualizados utilizando o conector TPL do programa R com a base de dados *The Plant List*, agora *World Flora Online* (<http://www.worldfloraonline.org/>), complementando com informações das bases de dados do site da Flora do Brasil 2020 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/>) e *International Plant Names Index* (<https://www.ipni.org/>). As classificações taxonômicas das espécies em famílias botânicas e clados seguem as orientações da APG IV (Group *et al.*, 2016). Os dados foram tabulados e tratados no programa Excel 2013 e Google Sheets e as análises foram realizadas utilizando os programas RStudio (RStudio Team 2020) e Excel (2013). Os esteroides foram identificados e classificados de acordo com as bases de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e KEGG Pathway Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). A revisão foi realizada seguindo os passos descritos no **Quadro 1**.

Quadro 1: Etapas da Revisão Fonte

Etapa 1	Elaboração das questões da pesquisa
Etapa 2	Elaboração de estratégias de busca booleana
Etapa 3	Identificação de estudos relevantes
Etapa 4	Síntese das evidências
Etapa 5	Elaboração dos bancos de dados
Etapa 6	Interpretação dos dados

Fonte: elaborado pelo autor.

1.2.3 Categorização dos resultados para fins de análise:

Dentre os estudos de detecção e identificação reunidos, foram identificados 14 metodologias e equipamentos diferentes para a detecção e identificação destas substâncias. Para homogeneizar resultados, para cada unidade amostral (UA) foi atribuído um valor de presença (1) ou ausência (0) relacionado ao resultado positivo ou negativo das detecções.

Para fins de padronização para análise e visualização dos dados, os esteroides investigados nos artigos foram classificados em três categorias: andrógenos, estrógenos e progesteronas, de acordo com suas funções em mamíferos e posições na rota metabólica espelhando o método utilizado por Simons e Greenwich (1989), atualizado através da base de dados PubChem (2021). Foram classificados como andrógenos os artigos que apresentavam detecções de androstenediona (Šaden-Krehula, Tajić e Kolbah, 1971, 1979; Saden-Krehula e Kolbah, 1983; Hartmann, Lacorn e Steinhart, 1998), androsterona (Simerský *et al.*, 2009), dehidrotestosterona e testosterona (Šaden-Krehula, Tajić e Kolbah, 1971; Simons e Greenwich, 1989; Hartmann, Lacorn e Steinhart, 1998). As amostras que apresentaram detecções de estrogênios, estrona e 17 β -estradiol (Bennett, Ko e Heftmann, 1966; Zhang, Yang e Tsao, 1991; Hartmann, Lacorn e Steinhart, 1998), foram classificadas dentro de estrógenos, e as progesteronas, além da progesterona em si, foram inseridos no banco de dados também algumas amostras com detecção de pregnenolona (Hartmann, Lacorn e Steinhart, 1998).

Além destes esteroides, é importante citar que a presença de esteroides intermediários da rota da formação de testosterona como androstenediol e dehidroepiandrosterona também foram identificados em diversas espécies vegetais (Simons e Greenwich, 1989). Também foram encontrados artigos que detectaram o feromônio androstenona em espécies de angiospermas (Saden-Krehula e Kolbah, 1983; Simons e Greenwich, 1989); e também de Iso-androsterona (epiandrosterona) no rizoma de *Curcuma mangga* Valetton & Zijp por Waman e colaboradores (Waman, Bohra e Sounderarajan, 2018). Como foram poucas amostras e os esteroides não se enquadraram em nenhuma das três classificações (progesterona, andrógenos e estrógenos) estas amostras não foram consideradas nas análises.

Com relação aos tecidos estudados, não houve padronização entre as pesquisas, conseqüentemente, cada trabalho investigou extratos de uma ou mais partes da planta diferentes e as padronizações variaram de artigo para artigo. No intuito de homogeneizar os dados para os testes estatísticos, os tecidos foram separados em: caule (bulbo, estolão, casca, caule, tubérculo), folha (lâmina foliar, pecíolo), fruto (fruto verde, fruto maduro), semente (óleo da semente, farinha da semente, semente), raiz, estruturas reprodutivas (flores,

inflorescências, botão floral, estróbilos, pólen). Amostras em indivíduos juvenis, plântulas, raízes, sementes e estudos com a planta inteira (Tab 1) ou não somaram amostras suficientes para comparação estatística ou não apresentaram homogeneidade suficiente nas amostragens e não foram incluídos nas análises.

Para alcançar o mesmo número de amostras por tecidos e clados para as análises estatísticas, foram separados os tecidos e táxons com mais amostras e desconsideradas as duplicatas. Em caso de duas amostras no mesmo tecido e na mesma espécie com resultados diferentes, foi escolhido o resultado mais recente e com métodos de identificação mais precisos. Quando o número de amostras de tecidos de folha excedia o número de amostras de tecidos florais, por exemplo, as amostras excedentes foram selecionadas a partir de um gerador de números aleatórios e desconsideradas. Para as análises dos dados binários, foram utilizados os testes não paramétricos Kruskal-Wallis (Kruskal e Wallis, 1952) e Wilcoxon-Pareado (Wilcoxon, 1945). Estes testes foram realizados quando havia homogeneidade nas amostras e mais do que 5 espécies amostradas para cada órgão, família e clado analisados.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Progesterona e seus Derivados em Plantas

Os esteroides têm um papel fundamental na transmissão de sinais que mediam processos fisiológicos cruciais em organismos pluricelulares. São moléculas lipofílicas de baixo peso molecular e baixa solubilidade em água. Derivados de esteróis, são encontrados nos organismos eucariontes como bactérias, fungos, animais e plantas. O produto final da síntese de esteroides em animais, o colesterol, tem importante papel na organização e dinâmica das membranas, e atua como um precursor lipossolúvel de vitaminas e hormônios esteroides. Conhecemos, atualmente, diversos produtos da rota biossintética dos esteróis em plantas, entre eles o sitosterol, stigmasterol, campesterol e, também o colesterol (Schaller, 2004; Vriet, Eugenia e Reuzeau, 2013).

Dos esteroides derivados da rota do colesterol em animais, os hormônios esteroides com a estrutura baseada em um esqueleto de 21 carbonos (C₂₁) e seus derivados que este trabalho trata são classicamente divididos em estrógenos, andrógenos e progesteronas (Fig. 2). Estas substâncias são consideradas hormônios em animais pois são sintetizadas nestes organismos e transportadas internamente para atingir células ou tecidos alvo onde se ligam a proteínas receptoras específicas e desencadeiam respostas fisiológicas sistêmicas. É importante salientar que todo hormônio esteroidal é um esteroide, mas nem todo esteroide é

um hormônio. Nas células procarióticas, por exemplo, esteroides tem uma função importantíssima na configuração da estrutura da membrana lipoprotéica (Murray et al., 2003; Lednicer, 2011).

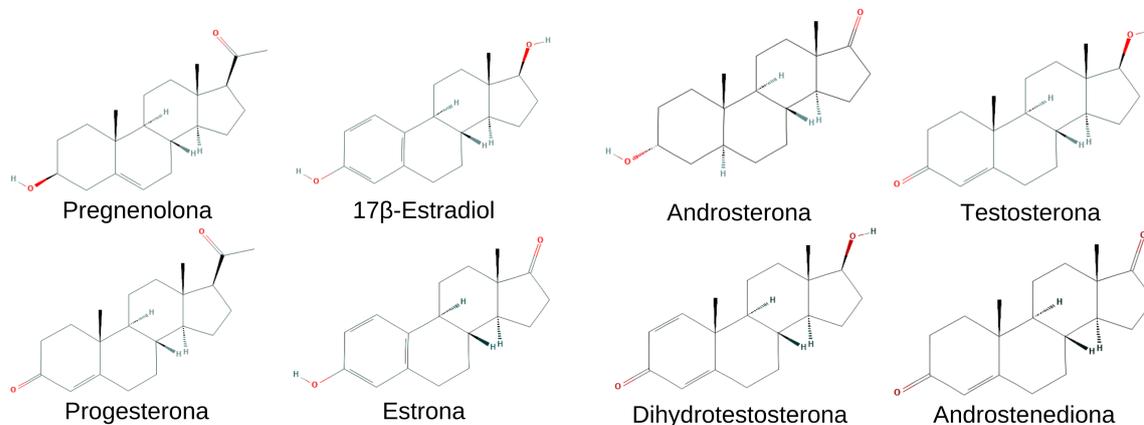


Figura 2. Estruturas de pregnanos, alopregnanos e estranos selecionados Fonte: PubChem, adaptado pelo autor a partir de Tarkowská (2019).

Revisões e trabalhos mais recentes vêm chamando atenção para a possibilidade destes esteroides terem potencial para serem encarados como hormônios vegetais. Tarkowska (2019) baseada em de Davies (2010) resume que para uma substância ser incluída em uma lista de hormônios vegetais, deve atender a três critérios: influenciar processos fisiológicos em baixas concentrações; estar onipresente em todos os reinos das plantas; e que o receptor-proteína para a sua percepção seja conhecido. Por fim, Janeczko (2012) em sua revisão sobre a presença e atividade da progesterona no reino vegetal discute que os dois primeiros critérios já estão razoavelmente explorados, mas que o conhecimento que temos com relação ao terceiro critério em organismos vegetais ainda é insuficiente e não nos permite classificá-los como hormônios (Davies, 2010; Erdal e Dumlupinar, 2011; Janeczko, 2012; Tarkowská, 2019).

Nas buscas realizadas nos acervos de bibliografia acadêmica não foram encontrados registros de trabalhos que identificaram ou isolaram em plantas, receptores nucleares de esteroides ou respectivos genes codificantes. Entretanto, Milanesi e Boland, em 2004, relataram observar sítios de ligação específicos ao esteroide 17β-estradiol, derivado de pregnanos, em frações do citoplasma e núcleo, em amostras de *Solanum glaucophyllum* Desf. (Milanesi e Boland, 2004). Janeczko e colaboradores (2008 e 2013) também observaram sítios de ligação de progesterona no citosol e na membrana plasmática de variedades de *Triticum aestivum* L. (Janeczko *et al.*, 2008, 2013). Ademais, alguns autores relatam

identificar, em espécies vegetais, genes homólogos aos que codificam proteínas de ligação a esteroides e associadas às membranas celulares de animais (Kao *et al.*, 2005). Yang e colaboradores demonstraram que o gene MSBP1 codifica uma proteína de ligação de esteroides localizada na membrana plasmática. Além disso, a partir de plantas alteradas para super expressarem ou serem deficientes deste gene, demonstraram que a MSBP1 funciona como um regulador negativo de alongamento celular em *Arabidopsis thaliana* (L.), afetando genes específicos de alongação celular e também do metabolismo de esteróis.

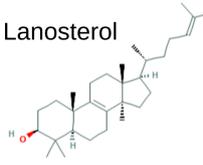
Também observaram que a proteína MSBP1 se liga com alta afinidade à progesterona e menor afinidade com outros esteroides, em ordem: 5-dihidrotestosterona, 24-epi-brassnolideo e stigmasterol (Yang, Xu e Xue, 2005). A partir destes resultados, os autores levantaram a hipótese de que, em organismos vegetais, as respostas fisiológicas e/ou transcricionais desencadeadas por estes esteroides são provavelmente mediadas por mecanismos alternativos citoplasmáticos (Kao *et al.*, 2005; Yang, Xu e Xue, 2005; Janeczko *et al.*, 2008, 2013; Filek *et al.*, 2017).

1.3.2 Biossíntese de esteroides em plantas

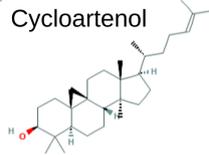
Segundo Kreis e Müller-Uri (2010), os esteroides presentes nas plantas podem ser divididos em sete grandes grupos (Fig. 3), dentre os quais encontramos os “estranos” e os “pregnanos e alopregnanos”, que abarcam os esteroides C21 e derivados. Apesar de amplamente descritas em vertebrados, em especial nos mamíferos, as rotas metabólicas destes esteroides C21 e derivados em plantas ainda não estão totalmente elucidadas (Kreis e Müller-Uri, 2010). Nos vertebrados algumas destas substâncias, derivadas do colesterol, como estrógenos, andrógenos e progesteronas, são uma classe de metabólitos biologicamente ativos e são conhecidas como hormônios esteroides. A presença destas substâncias, em especial o estradiol, já vem sendo estudada em organismos vegetais desde meados de 1930 (Janeczko e Skoczowski, 2005).

Esteróis

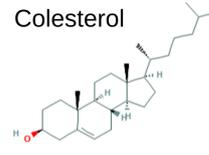
Lanosterol



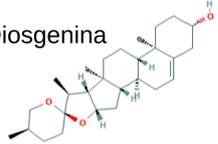
Cycloartenol



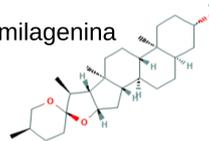
Colesterol

Saponinas

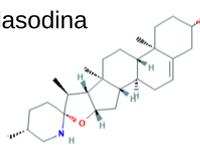
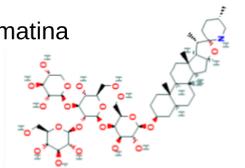
Diosgenina



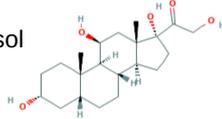
Smilagenina

Alcalóides Esteroidais C27

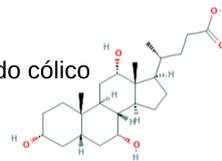
Solasodina

 α -TomatinaAlcalóides e Ácidos Biliares

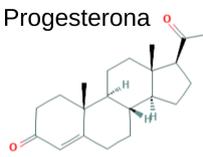
Urocortisol



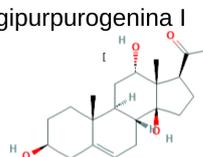
Ácido cólico

Pregnanos e Alopregnanos

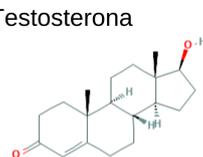
Progesterona



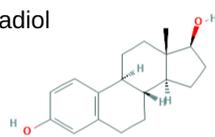
Digipurpurogenina I



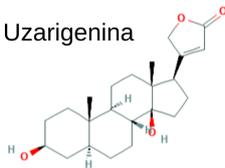
Testosterona

Estranos

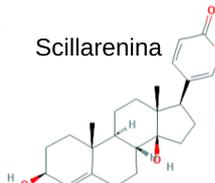
Estradiol

Glicosídeos Cardíacos

Uzarigenina



Scillarenina



Digitoxigenina

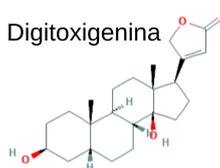


Figura 3. Sete grupos de esteroides presentes nas plantas e exemplos, segundo Kreis e Müller-Uri (2010). Fonte: PubChem (2020), adaptado de Kreis e Müller-Uri (2010)

Nas plantas, os esqueletos esteroidais são formados pelo encadeamento de unidades de 5 átomos de carbono denominadas isoprenos. Derivados isoprenoides, denominados de maneira geral de terpenos, são encontrados na maioria dos seres vivos tanto em eucariotos (plantas, animais e fungos), quanto em procariotos. Duas rotas biossintéticas são conhecidas para a formação de isoprenos, a rota do Ácido Mevalônico (MVA) que ocorre no citosol, e a via do Metileritritol Fosfato (MEP) que ocorre dentro dos plastídios. Ambas rotas, MVA e MEP, ocorrem simultaneamente em animais e plantas traqueófitas, mas somente a MEP está presente em algas verdes e eubactérias (Murray *et al.*, 2003; Tarkowská e Strnad, 2018) (Fig. 4).

Estas unidades isoprenoides combinam-se para formar esqualeno, molécula linear com 30 carbonos. Após algumas reações de ciclização forma-se uma substância de 4 anéis carbônicos, o cicloartenol, precursora de diversos metabólitos secundários esteroidais. As reações finais da rota de biossíntese dos esteroides permanecem majoritariamente desconhecidas, em especial para os esteroides C21 e derivados (Zhang *et al.*, 2017). Alguns pesquisadores acreditam que a pregnenolona, em vegetais, possa ser formada a partir dos seguintes precursores esteróis: campesterol, sitosterol, colesterol, stigmasterol ou lanosterol (Ginzberg, Tokuhisa e Veilleux, 2009; Ohyama *et al.*, 2009; Kreis e Müller-Uri, 2010; Janeczko, 2012; Zhang *et al.*, 2017; Tarkowská, 2019).

A pregnenolona é a substância precursora dos esteroides andrógenos (C19) e estrógenos (C18). Diversos trabalhos citam a presença e metabolismo de pregnanos em tecidos vegetais (Pollio *et al.*, 1996; Iino *et al.*, 2007; Janeczko, 2012). Em animais, as progesteronas, estrógenos e andrógenos interligam-se biossinteticamente e geralmente compartilham dos mesmos precursores (Fig. 5). Há diversos estudos mais antigos que citam a conversão entre colesterol, progesterona e pregnenolona em tecidos vegetais (Bennett e Heftmann, 1965; Sauer, Bennett e Heftmann, 1967; Bennett, Sauer e Heftmann, 1968; Furuya, Hirotsu e Kawaguchi, 1971; Stohs e El-Olemy, 1971; Yagen, Gallili e Mateles, 1978), e entre diferentes andrógenos e derivados (Schneider, 1970; Hirotsu e Furuya, 1974; Lin, Proebsting e Heftmann, 1979; Lin, Palevitch e Heftmann, 1983).

Mais recentemente, com o avanço das técnicas de PCR e sequenciamento, os estudos em relação às rotas metabólicas se debruçaram na busca e identificação de enzimas capazes de realizar estas reações em organismos vegetais. Um dos fatores que instigou estes estudos foi o aumento do interesse comercial e nos glicosídeos cardíacos, conhecidos também como cardenolídeos (Fig 3). Além da descoberta e descrição dos brassinosteróides (Fig. 6) e no seu reconhecimento como hormônios vegetais (Janeczko, 2012; Vriet, Eugenia e Reuzeau,

2013). Ambos derivam das rotas metabólicas dos compostos derivados do mevalonato, ou os isoprenoides e, assim, compartilham precursores em comum (Kreis e Müller-Uri, 2010; Lindemann, 2015). Levando em conta a não especificidade de algumas enzimas, o compartilhamento de precursores e a similaridade entre as substâncias, diversos autores estudaram a hipótese de que, nos organismos vegetais, a esteroidogênese pode compartilhar diversas enzimas com a rota dos fitosteróis (Ohyama *et al.*, 2009; Sonawane *et al.*, 2016) e brassinosteróides (Rosati *et al.*, 2003; Yang, Xu e Xue, 2005; Bauer *et al.*, 2010).

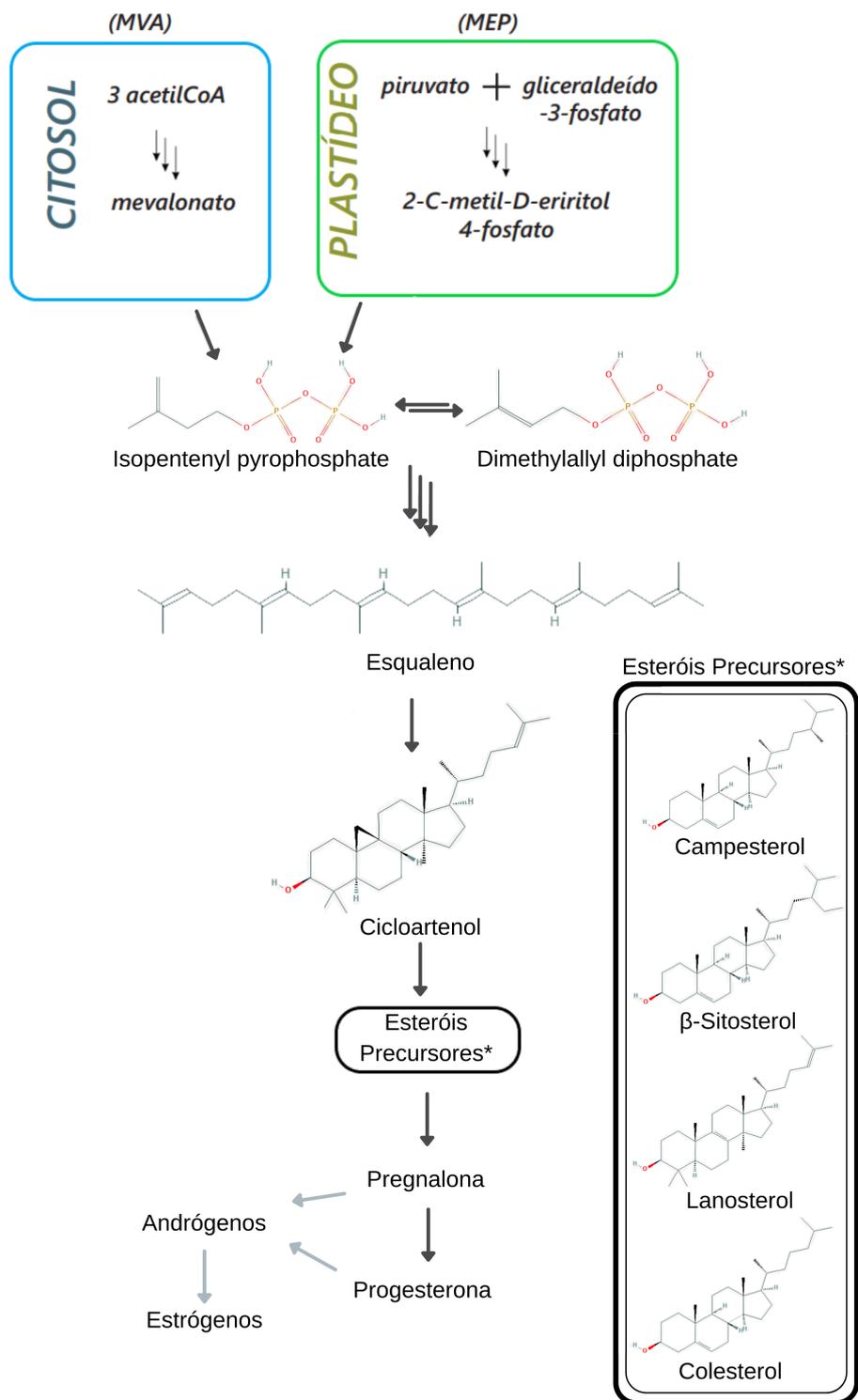


Figura 4. Rota simplificada de biossíntese em organismos vegetais de pregnanos e derivados. Fonte: Adaptado de Lindemann (2015), Janeczko (2005), Ginzberg (2009), Kreis e Muller Uri (2010), Tarkowska e Strnard (2018), e Tarkowska (2019). (Para mais informações quanto aos genes envolvidos na regulação e enzimas chave destas rotas , ver: Vriet, Eugenia and Reuzeau, 2013; Sonawane et al., 2016; Zhang et al., 2017; Qiao et al., 2018)

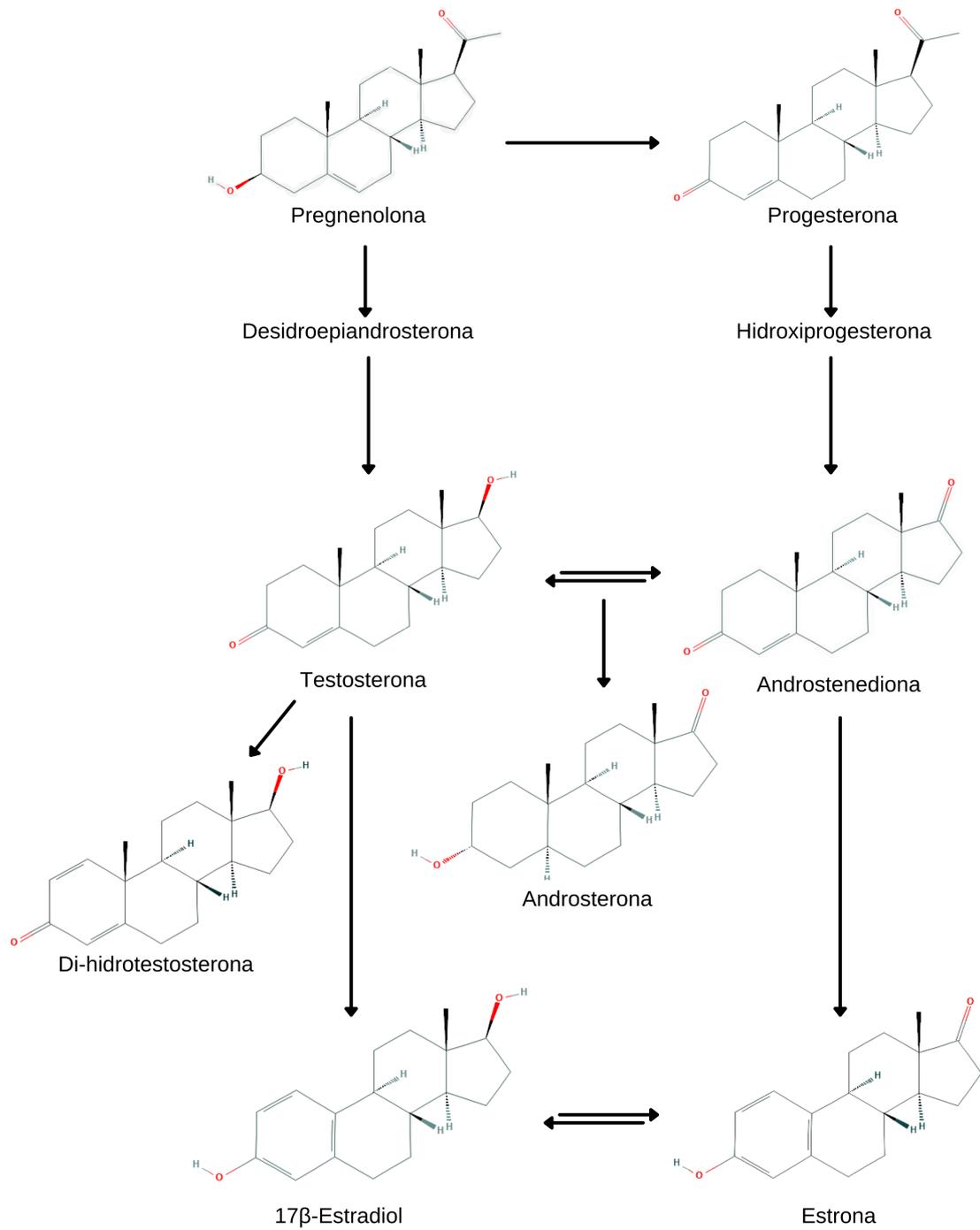


Figura 5. Conexões biossintéticas entre pregnanos e estrógenos selecionados. Fonte: PubChem, adaptado de Hartmann, Lacom e Steinhart (1998).

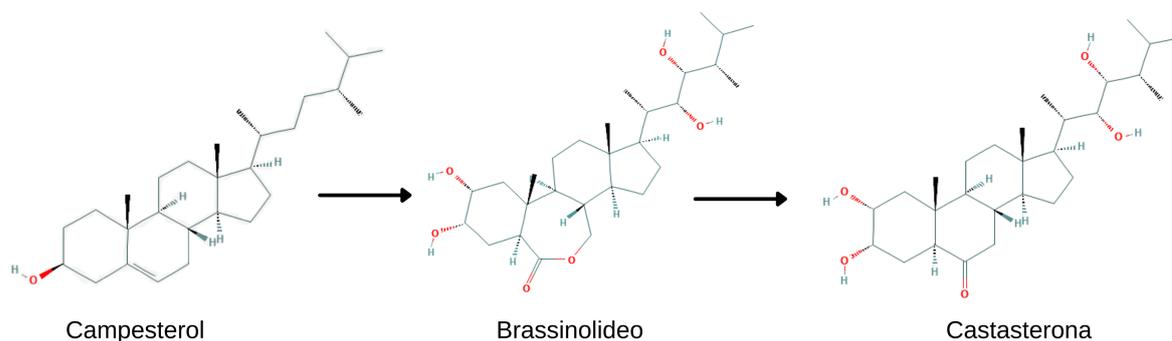


Figura 6. Estruturas de precursor e síntese de esteroides brassinolídeos selecionados. Fonte: PubChem e KEGG.

1.3.3 Ação dos esteroides no desenvolvimento primário e reprodutivo em plantas

Entende-se o metabolismo primário das plantas como as reações fisiológicas e bioquímicas que envolvem o desenvolvimento primário e reprodutivo, desde a germinação até o crescimento e desenvolvimento de órgãos vegetativos e reprodutivos (Taiz *et al.*, 2017). O conhecimento das funções metabólicas das progesteronas, estrógenos e andrógenos, em organismos vegetais, ainda possui lacunas. Evidências indicam que estas substâncias influenciam o desenvolvimento primário, tendo ação estimulante na germinação, no crescimento vegetativo e reprodutivo. Uma das metodologias mais utilizadas para tentar inferir a ação destes esteroides em plantas é a aplicação exógena destas substâncias nos tecidos destes organismos.

Janeczko e colaboradores observaram resultados que indicam que a aplicação de um andrógeno teve impacto na fotossíntese através de gerência de água e na resposta ao estresse hídrico por meio da expressão genética relacionada com as aquaporinas e suas atividades. Os autores também concluem que possa ter ação estabilizadora nas membranas celulares (Janeczko, Kocurek e Marcińska, 2012; Janeczko *et al.*, 2015). Os resultados de Mohareb e colaboradores (2017) corroboram com estas hipóteses ao relatarem que a concentração de androstenediol, androsterona e androstadienediona na casca e acículas de *Pinus halepensis* Mill. varia de acordo com a altitude (Mohareb *et al.*, 2017).

Diversos pesquisadores encontraram indícios da ação estimulante destes esteroides, quando aplicados em baixas concentrações, na germinação, no crescimento e desenvolvimento vegetativo (Iino *et al.*, 2007; Dumlupinar *et al.*, 2011; Erdal e Dumlupinar, 2011) e reprodutivo (Gawienowski, Cheney e Marsh, 1971; J Kopcewicz e Porazinski, 1974; Ylstra *et al.*, 1995; Janeczko *et al.*, 2003). Upadhyay e Maier (2016) observaram além de uma indução do crescimento primário e rendimento de síliquas (fruto) em *Arabidopsis thaliana*

(L.) Heynh. quando aplicadas baixas concentrações de 17β -estradiol, um efeito de inibição fotossintética, do crescimento e do rendimento das silíquas com a aplicação de altas concentrações. Iino e colaboradores (2007) obtiveram resultados similares quanto às respostas de indução e inibição fisiológica a baixas e altas concentrações respectivamente. Este efeito estimulante em menores concentrações e de inibição ou toxidez em altas concentrações indica que esta substância pode ter um efeito regulatório similar a um hormônio (Iino *et al.*, 2007; Upadhyay e Maier, 2016).

1.3.4 Relação de esteroides com a tolerância a condições de estresse abiótico em plantas

O metabolismo protetivo e adaptativo, ou a resposta a condições ambientais, é essencial às adaptações fisiológicas necessárias para a sobrevivência das plantas às mudanças, perturbações e estímulos ambientais. Existem diversas evidências de que pregnanos e alopregnanos podem atuar regulando mecanismos metabólicos de adaptação a condições de estresse ambiental.

Há indícios que a aplicação de progesterona e 17β -estradiol diminui o tempo de vernalização (florescimento após exposição a baixas temperaturas) de uma variedade de trigo de inverno, *Triticum aestivum* L., em até 30 dias (Janeczko e Filek, 2002). Filek e colaboradores, ao estudar membranas celulares de duas variedades de trigo com tolerâncias diferentes ao frio, observaram que a aplicação de progesterona desencadeou adaptações essenciais relacionadas à tolerância aos efeitos negativos do estresse por baixas temperaturas (Filek *et al.*, 2017). Além disso, aplicações exógenas destas substâncias em organismos vegetais submetidos a condições de estresse salino atenuaram significativamente os efeitos destrutivos deste estresse (Erdal, 2012), e apresentaram ação protetiva nas sementes e plântulas de *Lens culinaris* Medik. (lentilha) submetidas à contaminação por metais pesados (Chaoui e El Ferjani, 2013).

Em dois trabalhos, Janeczko e colaboradores (2008 e 2013) identificaram, em variedades de *Triticum aestivum* L., sítios de ligação de progesterona no citosol e na membrana plasmática. Além disso, observaram mudanças na quantidade e distribuição destes sítios em resposta ao estresse por baixas temperaturas e ao estresse de seca. Estas mudanças variaram também de acordo com a maior ou menor resistência da variedade a estes estresses. Concluíram que as mudanças ambientais são refletidas nas mudanças nas concentrações de sítios de ligação celulares de esteroides, e que estes estão provavelmente envolvidos na regulação dos metabolismos celulares (Janeczko *et al.*, 2008, 2013). Janeczko neste trabalho de 2013, seguindo o modelo de Yang e colaboradores (2005), sugere que a regulação negativa

de crescimento celular observada em ambos experimentos pode ser parte de mecanismo de resistência ao stress nestes organismos (Yang, Xu e Xue, 2005). Por fim, Salimi, Maroufi e Majdi (2005) observaram diferenças nos níveis de transcrição do gene que codifica a enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD), que catalisa reações entre pregnenolona e progesteronas, em resposta à estresse hídrico (seca) e de temperatura (frio) (Zhang *et al.*, 2017; Salimi, Maroufi e Majdi, 2018).

Já existem diversas evidências de que esteróis e brassinosteróides derivados são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e resistência ao stress abiótico; e evidências recentes sugerem um papel regulatório de esteróis em diversos processos fisiológicos, independente do seu papel como precursores de brassinosteróides (Vriet, Eugenia e Reuzeau, 2013). Evidências apontam que pregnanos e alopregnanos também podem estar envolvidos em processos de resistência a stress abiótico, crescimento e desenvolvimento vegetal. Ao considerarmos estudos a nível proteico-molecular que sugerem que estas substâncias compartilham enzimas da rota biogênica e proteínas de ligação, com diferentes graus de afinidade, podemos considerar que estas rotas estejam intimamente interligadas a partir deste compartilhamento de proteínas.

1.3.5 Banco de Dados

Os resultados foram gerados a partir das informações disponibilizadas pelas investigações com relação à presença de estrógenos, andrógenos e progesteronas em tecidos e espécies botânicas. Algumas considerações são importantes, antes de apresentar e discutir os resultados. É evidente que há uma gama de investigações e publicações sobre o assunto além do que foi reunido neste recorte, que, afinal, limitou-se majoritariamente a trabalhos publicados na língua inglesa e em bancos de dados específicos, ainda que abrangentes. Apesar destas limitações, o intuito é contribuir para as discussões sobre o tema.

Os esforços da busca retornaram um total de 72 artigos dentro do escopo da investigação, a partir dos trabalhos encontrados, foi possível categorizá-los em quatro grupos, de acordo com as metodologias empregadas: Aplicação Exógena (35), Detecção e Identificação (25), Revisão de literatura (9), Outras metodologias (3), é importante apontar que alguns artigos empregaram mais de uma metodologia. Para a montagem do banco de dados, somente os estudos de Detecção e Identificação foram utilizados, os demais integraram a revisão.

A partir dos dados reunidos dos 25 artigos de Detecção e Identificação, resgatamos o resultado de 740 UA (frequência absoluta) em 154 espécies vegetais

pertencentes a 53 famílias botânicas diferentes que foram amostradas para estas substâncias. Os testes se mostraram bem distribuídos entre as três classes de esteroides, em parte, isso pode ter se dado pelo fato de que o artigo com maior esforço amostral (509 UA), buscou substâncias pertencentes às três classes hormonais (Simons e Greenwich, 1989).

A maior parte dos estudos foi feita em espécies de angiospermas (Magnoliophyta), pertencendo a este grupo 146 das 152 espécies amostradas (Fig. 4b). Dentre as outras espécies, foram encontradas amostras de uma espécie de Monilophyta, *Equisetum hyemale* L. e cinco espécies de Coniferophyta. Entre as angiospermas, as famílias das espécies mais amostradas (frequência absoluta) foram Poaceae e Asteraceae, seguidas de Fabaceae, Apiaceae, Rosaceae e Brassicaceae. Um maior número de amostragens nestas famílias pode estar refletindo não só o fato de que estas são famílias que comportam uma grande diversidade de espécies, como também um grande interesse de estudo devido a diversas espécies de consumo e uso cotidiano humano (alimentício, medicinal, ecológica-restauração) estarem inseridas nestas famílias. Um resumo dos dados levantados pode ser encontrado na Tab. 1.

Tabela 1: a. Tabela com dados de espécies amostradas (E), número de amostras (UA), e frequências absolutas (Fa) e relativas (Fr) de presenças (P) por órgãos vegetais (incluídos testes em juvenis e nos extratos de planta inteira)

a.	Progesterona				Andrógenos				Estrógenos			
	E (Fa)	UA (Fa)	P (Fa)	P (Fr)	E (Fa)	UA (Fa)	P (Fa)	P (Fr)	E (Fa)	UA (Fa)	P (Fa)	P (Fr)
Tecidos Vegetais												
Raiz	5	5	5	100,00	3	4	2	50,00	6	6	2	33,33
Caule	33	36	27	75,00	30	32	11	34,38	29	30	5	16,67
Folha	77	96	69	71,88	75	99	37	37,37	72	83	39	46,99
Estruturas Reprodutivas	27	35	29	82,86	25	39	29	74,36	28	37	16	43,24
Fruto	7	8	7	87,50	6	6	3	50,00	6	8	3	37,50
Semente	22	27	25	92,59	20	23	22	95,65	21	23	11	47,83
Juvenis	3	3	3	100,00	1	1	0	0,00	1	1	0	0,00
Indivíduo Inteiro	45	46	36	78,26	45	46	35	76,09	45	46	23	50,00

Tabela 1: b. Tabela com dados de espécies amostradas (E), número de amostras (UA), e frequências absolutas (Fa) e relativas (Fr) de presenças (P) por cladogramas botânicos selecionados.

b.	Progesterona				Andrógénos				Estrógenos			
	E (Fa)	UA (Fa)	P (Fa)	P (Fr)	E (Fa)	UA (Fa)	P (Fa)	P (Fr)	E (Fa)	UA (Fa)	P (Fa)	P (Fr)
Clados Botânicos												
Magnoliophyta	120	249	194	77,91	96	236	125	52,97	73	228	94	41,23
Monocotiledôneas	25	55	41	74,55	27	53	31	58,49	14	49	17	34,69
Eudicotiledôneas	94	192	151	78,65	68	181	92	50,83	58	177	75	42,37
Asterid	45	98	78	79,59	24	89	42	47,19	24	78	31	39,74
I	16	34	28	82,35	4	27	14	51,85	8	22	1	4,55
II	24	59	45	76,27	15	56	23	41,07	12	51	16	31,37
Rosid	43	78	67	85,90	35	75	42	56,00	30	83	39	46,99
I	31	57	50	87,72	26	52	34	65,38	20	56	29	51,79
II	11	20	16	80,00	8	22	7	31,82	9	26	10	38,46
Pinophyta	4	6	6	100,00	5	13	13	100,00	2	5	4	80,00
Monilophyta	1	1	1	100,00	1	1	1	100,00	1	1	1	100,00

Fonte: elaborado pelo autor.

Progesterona

Das 256 UA, 201 tiveram resultado positivo para presença de progesterona em algum tecido vegetal, a frequência relativa de aproximadamente 78,52% (Tab. 1 a). Com relação aos tecidos, de acordo com as frequências relativas, dentre as progesteronas, os resultados parecem indicar que não há diferenças evidentes na detecção da presença desta, entre os órgãos analisados. Para análise estatística, 9 espécies com testes em tecidos do caule, estruturas reprodutivas e folha foram utilizadas. Tanto o teste Kruskal-Wallis ($p\text{-value} = 0,2725$) quanto Wilcoxon ($p\text{-values}$: estruturas reprodutivas-caule=0,14; estruturas reprodutivas-folha=0,36; folha-caule=0,58) não identificaram diferenças significativas entre as detecções nos três órgãos estudados (Fig. 7a).

As famílias com mais espécies amostradas para progesterona foram *Poaceae* e *Asteraceae* com 16 espécies cada e *Fabaceae* com 11 espécies. As famílias botânicas com maior número de amostras (UAs) para progesterona foram a monocotiledônea *Poaceae* e eudicotiledôneas *core Fabaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Brassicaceae* e *Rosaceae*. Dentro das famílias as frequências relativas de presença mantiveram-se acima de 50%, e a maioria acima de 70%, o que indica uma boa taxa de sucesso detecção comparada aos estrógenos e andrógénos. No intuito de testar diferenças na detectabilidade de progesterona entre os táxons botânicos, separamos as famílias mais amostradas para folha (10 espécies cada), *Poaceae* e *Asteraceae*. Segundo os resultados, não há diferenças (Kruskal-Wallis $p\text{-value} = 0,3458$;

Wilcoxon p -value = 0,3415) na detectabilidade de progesterona nas espécies destas duas famílias.

Os resultados indicam que há pelo menos uma detecção de progesterona em espécies de diversos clados distintos de angiospermas (Tab.1 b). A presença de progesterona detectada no caule e folhas de *Persea americana* Mill. (Lauraceae), testados por Simons & Greenwich (1989) indica a presença destas substâncias nas angiospermas mais basais. Além de ser detectada em diversas espécies de monocotiledôneas e eudicotiledôneas, os resultados positivos para detecção de progesterona também em 4 espécies de Pinaceae (Pinophyta) e em *Equisetum hyemale* L. (Monilophyta), sugerem que possa estar presente amplamente nas plantas terrestres. Apesar de caracterizado metabolismo de exógeno progesterona em organismos mais basais como em espécies do gênero *Chlorella* (Della Greca *et al.*, 1996; Pollio *et al.*, 1996), não foram encontrados trabalhos de detecção destas substâncias endógenas nestes organismos.

Como havia poucas espécies amostradas para progesterona em Pinaceae, não foi possível incluí-las nos testes estatísticos e estes foram realizados somente com as amostras de angiospermas. Para testar se há diferenças na presença destas substâncias entre clados botânicos, amostragens de folha de 17 espécies de monocotiledôneas, eudicotiledôneas rosídeas e eudicotiledôneas asterídeas foram testadas, os resultados não significativos (Kruskal-Wallis p -value=0,6725; Wilcoxon p -values > 0,39) indicam que não há diferença na presença e detectabilidade desta substância dentre as angiospermas (Fig. 7b).

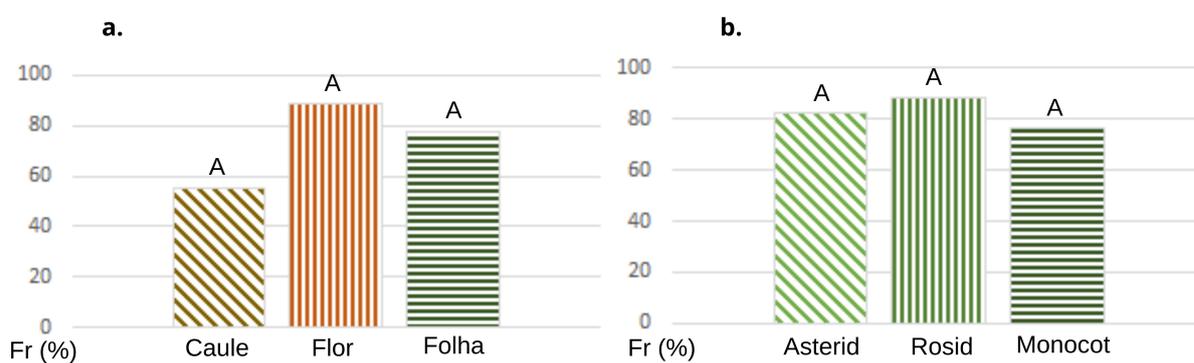


Figura 7. a. Frequência relativa da presença de progesterona em tecidos do Caule, estruturas reprodutivas e Folha de espécies de angiospermas b. Frequência relativa da presença de progesterona em amostras de tecidos da folha de espécies de asterídeas, rosídeas e monocotiledôneas (letras nas barras: letras iguais: $P > 0,05$; letras diferentes: $P < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor.

Andrógenos

De 250 amostragens em tecidos (UA), 139 amostras retornaram resultados positivos para a presença de andrógenos, com uma frequência relativa total de 51,23%. Com relação a sua presença nos órgãos, ao observar as frequências relativas, parece haver uma maior chance de andrógenos serem detectados em estruturas reprodutivas e sementes comparados aos tecidos vegetativos folha e caule (Tab. 1 a). Para análise estatística, 9 espécies com testes em tecidos do caule, estruturas reprodutivas e folha foram utilizadas. Os testes apontaram diferença significativa (Kruskal-Wallis p -value = 0,01832; Wilcoxon estruturas reprodutivas-caule p -value = 0,0066) entre as amostras de caule e estruturas reprodutivas, uma diferença marginal (Wilcoxon folha-caule p -value = 0,0588) entre folha e caule (Fig. 8a), sugerindo que a detectabilidade destas substâncias é maior nas estruturas reprodutivas do que nos caules, o que pode indicar presença destas em maiores quantidades nos tecidos reprodutivos. Ylstra e colaboradores (1995) demonstraram como andrógenos aplicados exógenamente no pólen de *Nicotiana tabacum* L. estimularam a germinação e crescimento do tubo polínico in vitro, o que pode indicar que estes desempenham papel nestes processos reprodutivos.

As famílias botânicas com mais espécies amostradas para a presença de andrógenos foram Poaceae com 12 espécies, Asteraceae com 11 espécies e Fabaceae com 8 espécies. As famílias mais amostradas (frequência absoluta) para estes esteroides também foram a monocotiledônea Poaceae e eudicotiledôneas core Fabaceae, Asteraceae, Apiaceae, Brassicaceae e Rosaceae.

Dentro das famílias, as frequências relativas de presença foram em geral menores que nos testes para progesterona, ficando abaixo de 60%. É importante pontuar que, entre as famílias mais amostradas, a frequência relativa foi relativamente mais baixa no caso das *Apiaceae*, (Fr de presença = 13,34). Levando em conta os resultados das análises de amostragens por órgão, este resultado pode ter sido influenciado pela maior parte dos testes nas espécies desta família ter sido realizados em tecidos vegetativos (folha e caule). Os testes estatísticos para as famílias mais amostradas para folha, *Poaceae* e *Asteraceae*, não retornou resultado significativo para diferenças entre as médias de detecção (Kruskal-Wallis p -value = 0,1888; Wilcoxon p -value = 0,233).

Foi detectado algum tipo de andrógeno em pelo menos uma espécie dos principais clados das angiospermas (Tab. 1 b). Assim como a progesterona, os andrógenos parecem estar presentes pelo menos desde angiospermas basais e em diversas espécies de monocotiledôneas e eudicotiledôneas. Fora das angiospermas, foram encontrados resultados positivos para

presença destas substâncias em tecidos das 4 espécies de Pinophyta e também na Monilophyta, *Equisetum hyemale* L., sugerindo que estas substâncias também estão presentes em outras divisões das plantas terrestres.

O resultado da análise das amostragens de folha de 9 espécies de monocotiledôneas, de rosídeas e de asterídeas não retornou valor p significativo para diferenças nas médias de detecção entre estes clados (Kruskal-Wallis p -value = 0.5778; Wilcoxon p -values > 0.32) (Fig. 8b). No entanto, ao comparar amostras de tecidos florais das espécies de Pinophyta, Rosídeas e Asterídeas (Fig. 8c), parece haver diferenças significativas entre as detecções de Asterídeas e Pinophyta (Kruskal-Wallis p -value = 0,04629; Wilcoxon Asterides-Pinaceae p -value=0,032), mas não encontrou diferenças entre rosídeas e as outras duas classes (Wilcoxon p -values > 0,14). Estes resultados podem estar refletindo uma diferença na detectabilidade entre os tecidos florais destes clados.

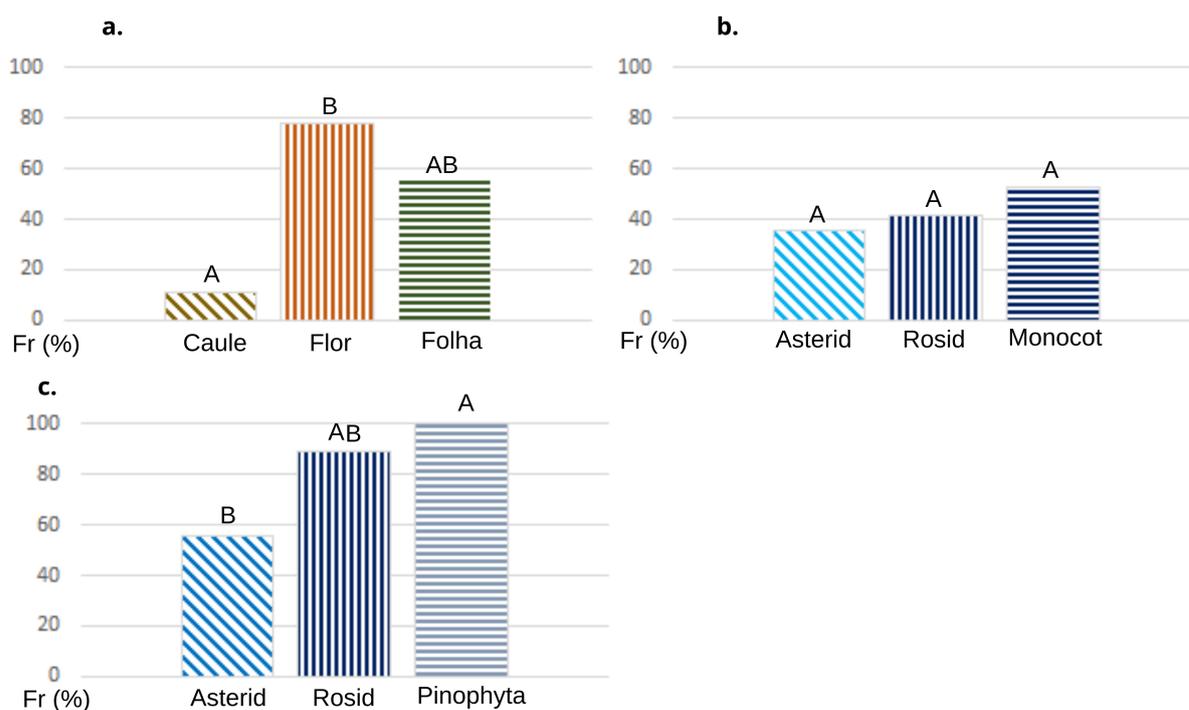


Figura 8. a. Frequência relativa da presença de esteroides andrógenos em tecidos do Caule, estruturas reprodutivas e Folha de espécies de angiospermas; b. Frequência relativa da presença de esteroides andrógenos em amostras de tecidos da folha de espécies de asterídeas, rosídeas e monocotiledôneas c. Frequência relativa da presença de esteroides andrógenos em tecidos florais de representantes de Asterídeas, Rosídeas e Pinophyta (letras iguais: $P > 0,05$; letras diferentes: $P < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor.

Estrógenos

Para estrógenos, o número de amostras foi menor, 233 UA das quais, 99 com resultado positivo para presença destes. Foi das classes de esteroides estudadas a que apresentou menor frequência relativa de presença, 40,64%. O órgão com menor frequência de detecção de presença deste esteroide foram os tecidos do caule (16,67%), e as frequências relativas não variam muito entre os outros tecidos (Tab. 1 a). Para análise estatística, 9 espécies com testes em tecidos do caule, estruturas reprodutivas e folha foram utilizadas. Os testes não apontaram diferença significativa (Kruskal-Wallis p -value=0,1518) entre as amostras (Fig. 9a). No teste de Wilcoxon, entre as amostras de caule e estruturas reprodutivas (p -value=0,144), e estruturas reprodutivas e folha (p -value=0.693) a diferença não foi significativa, mas apontou uma diferença marginal entre caule e folha (p -value=0.064).

Zhang e colaboradores (1991) demonstraram a presença e variação da quantidade de estrógenos endógenos no pólen, estiletos e pistilos em diversas etapas da polinização de nove espécies de angiospermas, ginkophyta e pinophyta, e associam estas variações à uma relação destas substâncias no desenvolvimento reprodutivo destes organismos. Corroborando com estes resultados, no trabalho de Ylstra e colaboradores (1995) estrógenos aplicados exogenamente no pólen de *Nicotiana tabacum* L., assim como andrógenos, estimularam a germinação e crescimento do tubo polínico.

As famílias com maior número de espécies amostradas para a presença destes esteroides foram Fabaceae, Asteraceae e Rosaceae com 12, 9 e 8 espécies respectivamente. As famílias mais amostradas para estrógenos foram as mesmas monocotiledônea e eudicotiledôneas também mais testadas para progesterona e andrógenos. Assim como para progesterona e andrógenos, os testes estatísticos para as famílias mais amostradas para folha, *Poaceae* e *Asteraceae*, não retornou resultado significativo para diferenças entre as médias de detecção (Kruskal-Wallis p -value= 1; Wilcoxon p -value= 1).

Além de ter sido detectada em pelo menos uma espécie dos principais clados dentro das angiospermas, também há registros de presença em duas espécies de Pinophyta, uma espécie de Equisetaceae (Tab.1 b) em uma espécie de Ginkgophyta (Zhang, Yang e Tsao, 1991). Assim como a progesterona e os esteroides andrógenos, existem evidências de que esteroides estrógenos também podem estar presentes amplamente nas plantas terrestres, mas ao contrário das outras substâncias, parece haver uma dificuldade maior na detectabilidade destes, o que pode ser consequência de estar presente em menos quantidades nestes organismos ou de uma maior dificuldade na purificação das amostras e identificação das

substâncias estrogênicas, em especial técnicas imunobaseadas, devido à similaridade dos sítios de ligação e reatividade com outros fitoestrógenos presentes em plantas (*cross-reactivity* e *imperfect validation*) (Wang, Prasain e Barnes, 2002; Iino *et al.*, 2007).

O resultado da análise das amostragens de folha de 17 espécies de monocotiledôneas, rosídeas e asterídeas, assim como para as outras substâncias analisadas, não retornou valor *p* significativo para diferenças nas médias de detecção entre estes clados (Kruskal-Wallis *p-value* =0.4994; Wilcoxon *p-values* > 0.32) (Fig. 9b). Não houve amostras de estruturas reprodutivas de Pinaceae suficientes para integrar as análises estatísticas, a comparação entre estruturas reprodutivas de asterídeas e rosídeas para estrógenos não retornou valor *p* significativo para diferenças (Kruskal-Wallis *p-value* = 0.1693).

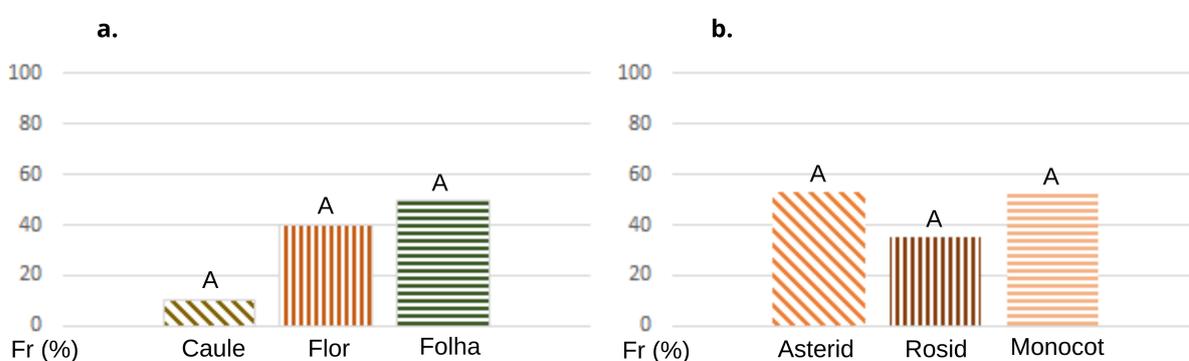


Figura 9. Frequência relativa da presença de esteroides estrógenos em tecidos do Caule, estruturas reprodutivas e Folha de espécies de angiospermas b. Frequência relativa da presença de esteroides estrógenos em amostras de tecidos da folha de espécies de asterídeas, rosídeas e monocotiledôneas (letras iguais: $P > 0,05$; letras diferentes: $P < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor.

1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações que dispomos com relação à presença, metabolismo e ação destes esteroides na fisiologia das plantas vêm sendo construídas a partir do esforço de diversos pesquisadores e grupos de pesquisa. A partir das estratégias de busca empregadas, foi possível reunir pistas sobre a importância destes esteroides no desenvolvimento primário e reprodutivo de plantas, além da sua influência no metabolismo de tolerância às condições de estresse abiótico destes organismos. Apesar destes indícios, o conhecimento atual na área é insuficiente para afirmar que atuam como hormônios no reino vegetal, há muito a se investigar ainda. Uma das lacunas encontra-se nas reações finais da rota de biossíntese destes esteroides, que permanecem majoritariamente desconhecidas em organismos vegetais, entretanto pesquisas recentes sugerem que provavelmente compartilham enzimas com a rota

dos fitosteróis. Outra lacuna está nos poucos dados que temos sobre receptores celulares, apesar de que já tenham sido observados sítios de ligação de 17β -estradiol em frações da membrana e núcleo de amostras de *S. glaucophyllum*, e proteínas de ligação com alta afinidade à progesterona e associados à membrana plasmática de *A. thaliana*.

A partir da abrangência taxonômica dos dados de detecção e identificação coletados, progesterona, estrógenos e andrógenos parecem estar presentes em grande parte das angiospermas (Magnoliophyta), alguns dados menos abundantes dão indícios de que possa estar presentes em outros grupos de plantas terrestres como Monilóphyta e Pinophyta. As diferenças significativas nas médias de identificações de andrógenos entre tecidos indica que possa haver maior probabilidade de encontrar estes esteroides em tecidos florais do que nos tecidos do caule. Parecem haver, ainda, diferenças na detectabilidade e presença de andrógenos em tecidos florais de espécies de Pinaceae e asterídeas. Dentre as classes estudadas, os estrógenos parecem ser o grupo com maior dificuldade na detecção e identificação em tecidos vegetais.

1.5 REFERÊNCIAS

- Aboelsoud, N. H. (2010) 'Herbal medicine in ancient Egypt', *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), pp. 082–086. doi: 10.5897/JMPR09.013.
- Bauer, P. *et al.* (2010) 'Highly conserved progesterone 5β -reductase genes (P5 β R) from 5β -cardenolide-free and 5β -cardenolide-producing angiosperms', *Phytochemistry*, 71(13), pp. 1495–1505. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.06.004.
- Bennett, R. D. and Heftmann, E. (1965) 'Progesterone: Biosynthesis from pregnenolone in *holarrhena floribunda*', *Science*, 149(3684), pp. 652–653. doi: 10.1126/science.149.3684.652.
- Bennett, R. D., Ko, S. tze and Heftmann, E. (1966) 'Isolation of estrone and cholesterol from the date palm, *Phoenix dactylifera* L.', *Phytochemistry*, 5(2), pp. 231–235. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85122-5.
- Bennett, R. D., Sauer, H. H. and Heftmann, E. (1968) 'Progesterone metabolism in *Digitalis lanata*', *Phytochemistry*, 7(1), pp. 41–50. doi: 10.1016/S0031-9422(00)88203-5.
- Chaoui, A. and El Ferjani, E. (2013) ' β -Estradiol Protects Embryo Growth from Heavy-Metal Toxicity in Germinating Lentil Seeds', *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(3), pp. 636–645. doi: 10.1007/s00344-013-9332-x.
- Cooper, C., Booth, A., Varley-Campbell, J., Britten, N., & Garside, R. (2018). Defining the process to literature searching in systematic reviews: A literature review of guidance and supporting studies. *BMC Medical Research Methodology*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12874-018-0545-3>
- David, B., Wolfender, J. L. and Dias, D. A. (2015) 'The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends', *Phytochemistry Reviews*, 14(2), pp. 299–315. doi: 10.1007/s11101-014-9367-z.
- Davies, P. J. (2010) 'The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions', *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Springer Netherlands, pp. 1–15. doi: 10.1007/978-1-4020-2686-7_1.

- Desmawati, D. and Sulastri, D. (2019) 'Phytoestrogens and Their Health Effect', *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(3), p. 495. doi: 10.3889/OAMJMS.2019.086.
- Dumlupinar, R. *et al.* (2011) 'Effects of progesterone, β -estradiol, and androsterone on the changes of inorganic element content in barley leaves', *Biological Trace Element Research*, 143(3), pp. 1740–1745. doi: 10.1007/s12011-011-8980-6.
- Erdal, S. (2012) 'Alleviation of salt stress in wheat seedlings by mammalian sex hormones', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(7), pp. 1411–1416. doi: 10.1002/jsfa.4716.
- Erdal, S. and Dumlupinar, R. (2011) 'Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants', *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), pp. 1011–1017. doi: 10.1007/s11738-010-0634-3.
- Filek, M. *et al.* (2017) 'Regulation of the membrane structure by brassinosteroids and progesterone in winter wheat seedlings exposed to low temperature', *Steroids*, 128(October), pp. 37–45. doi: 10.1016/j.steroids.2017.10.002.
- Furuya, T., Hirotani, M. and Kawaguchi, K. (1971) 'Biotransformation of progesterone and pregnenolone by plant suspension cultures', *Phytochemistry*. doi: 10.1016/S0031-9422(00)89931-8.
- Gawienowski, A. M., Cheney, R. W. and Marsh, H. V. (1971) 'Alteration of sex expression in the cucumber by testosterone and estradiol', *Phytochemistry*, 10(9), pp. 2033–2034. doi: 10.1016/S0031-9422(00)97190-5.
- Ginzberg, I., Tokuhisa, J. G. and Veilleux, R. E. (2009) 'Potato steroidal glycoalkaloids: Biosynthesis and genetic manipulation', *Potato Research*, 52(1), pp. 1–15. doi: 10.1007/s11540-008-9103-4.
- Della Greca, M. *et al.* (1996) 'Biotransformation of progesterone by the green alga *Chlorella emersonii* C211-8H', *Phytochemistry*, 41(6), pp. 1527–1529. doi: 10.1016/0031-9422(95)00786-5.
- Group, T. A. P. *et al.* (2016) 'An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV', *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), pp. 1–20. doi: 10.1111/BOJ.12385.
- Hartmann, S., Lacorn, M. and Steinhart, H. (1998) 'Natural occurrence of steroid hormones in food', *Food Chemistry*, 62(1), pp. 7–20. doi: 10.1016/S0308-8146(97)00150-7.
- Hirotani, M. and Furuya, T. (1974) 'Biotransformation of testosterone and other androgens by suspension cultures of *Nicotiana tabacum* "Bright yellow"', *Phytochemistry*, 13(10), pp. 2135–2142. doi: 10.1016/0031-9422(74)85015-6.
- Iino, M. *et al.* (2007) 'Progesterone: Its occurrence in plants and involvement in plant growth', *Phytochemistry*, 68(12), pp. 1664–1673. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.002.
- J Kopcewicz and Porazinski, Z. (1974) 'Effects of Growth Regulators, Steroids and Estrogen Fraction from Sage Plants on Flowering of a Long Day Plant, *Salvia splendens*, Grown under Non-inductive Light Conditions', *Biologia Plantarum (Praha)*, 16(2), pp. 132–135.
- Janeczko, A. *et al.* (2003) 'The influence of animal sex hormones on the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: Comparison with the effect of 24-epibrassinolide', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(2), pp. 147–151. doi: 10.1023/A:1022291718398.
- Janeczko, A. *et al.* (2008) 'Specific binding sites for progesterone and 17β -estradiol in cells of *Triticum aestivum* L.', *Acta Biochimica Polonica*, 55(4), pp. 707–711. doi: 10.18388/abp.2008_3031.
- Janeczko, A. (2012) 'The presence and activity of progesterone in the plant kingdom', *Steroids*, 77(3), pp. 169–173. doi: 10.1016/j.steroids.2011.10.012.
- Janeczko, A. *et al.* (2013) 'Endogenous progesterone and its cellular binding sites in wheat exposed to drought stress', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 138, pp. 384–394. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.07.014.

- Janeczko, A. *et al.* (2015) 'Disturbances in production of progesterone and their implications in plant studies', *Steroids*, 96, pp. 153–163. doi: 10.1016/j.steroids.2015.01.025.
- Janeczko, A. and Filek, W. (2002) 'Stimulation of generative development in partly vernalized winter wheat by animal sex hormones', *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(3), pp. 291–295. doi: 10.1007/s11738-002-0054-0.
- Janeczko, A., Kocurek, M. and Marcińska, I. (2012) 'Mammalian androgen stimulates photosynthesis in drought-stressed soybean', *Central European Journal of Biology*, 7(5), pp. 902–909. doi: 10.2478/s11535-012-0068-6.
- Janeczko, A. and Skoczowski, A. (2005) 'Mammalian sex hormones in plants', *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 43(2), pp. 71–79. doi: 10.5603/4616.
- Kadam, A., Barnabas, R. and Gaykar, B. (2017) 'HPLC analysis of Ethynylestradiol from seed extract of *Moringa oleifera* Lam', *Journal of Medicinal Plants Studies*.
- Kao, A. L. *et al.* (2005) 'Characterization of a novel *Arabidopsis* protein family AtMAPR homologous to 25-Dx/IZAg/Hpr6.6 proteins', *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46(2), pp. 107–118. doi: 10.7016/BBAS.200504.0107.
- Kreis and Müller-Uri (2010) *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. 2nd edn. Edited by M. Wink. Blackwell Publishing Ltd.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47, 583–621.
- Lednicer, D. (2011) *Steroid Chemistry at a Glance*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Lin, J. T., Palevitch, D. and Heftmann, E. (1983) 'Reduction of 4-androstene-3,17-dione by growing cucumber plants', *Phytochemistry*, 22(5), pp. 1149–1154. doi: 10.1016/0031-9422(83)80210-6.
- Lin, J. T., Proebsting, W. M. and Heftmann, E. (1979) 'Conversion of 4-androstene-3,17-dione to testosterone by *Pisum sativum*', *Phytochemistry*, 18(10), pp. 1667–1669. doi: 10.1016/0031-9422(79)80180-6.
- Lindemann, P. (2015) 'Steroidogenesis in plants - Biosynthesis and conversions of progesterone and other pregnane derivatives', *Steroids*, 103(August), pp. 145–152. doi: 10.1016/j.steroids.2015.08.007.
- Milanesi, L. and Boland, R. (2004) 'Presence of estrogen receptor (ER)-like proteins and endogenous ligands for ER in solanaceae', *Plant Science*, 166(2), pp. 397–404. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.10.006.
- Mohareb, A. *et al.* (2017) 'Chemical Composition and Activity of Bark and Leaf Extracts of *Pinus halepensis* and *Olea europaea* Grown in Al-Jabel Al-Akhdar Region, Libya Against some Plant Phytopathogens', *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 3(3), pp. 0–12. doi: 10.15406/jabb.2017.03.00067.
- Murray, R. k. *et al.* (2003) *Harper's Illustrated Biochemistry*. The McGraw-Hill Companies Inc.
- Ohyama, K. *et al.* (2009) 'Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), pp. 725–730. doi: 10.1073/pnas.0807675106.
- Pollio, A. *et al.* (1996) 'Biotransformations of progesterone by *Chlorella* spp.', *Phytochemistry*, 42(3), pp. 685–688. doi: 10.1016/0031-9422(95)00996-5.
- Preciado, P. B. (2008) 'Testo Yonki', *Espasa*, p. 173.
- Qiao, W. *et al.* (2018) 'Comparative transcriptome analysis identifies putative genes involved in steroid biosynthesis in *Euphorbia tirucalli*', *Genes*, 9(1). doi: 10.3390/genes9010038.
- Rosati, F. *et al.* (2003) 'New evidence of similarity between human and plant steroid metabolism: 5 α -reductase activity in *Solanum malacoxylon*', *Endocrinology*, 144(1), pp. 220–229. doi: 10.1210/en.2002-220649.

- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>
- Saden-Krehula, M. and Kolbah, D. (1983) '17-Ketosteroids in *Pinus nigra* Ar.', *Naturwissenschaften*, 70, pp. 520–522.
- Šaden-Krehula, M., Tajić, M. and Kolbah, D. (1971) 'Testosterone, epitestosterone and androstenedione in the pollen of scotch pine *P. silvestris* L.', *Experientia*, 27(1), pp. 108–109. doi: 10.1007/BF02137770.
- Šaden-Krehula, M., Tajić, M. and Kolbah, D. (1979) 'Sex hormones and corticosteroids in pollen of *Pinus nigra*', *Phytochemistry*, 18(2), pp. 345–346. doi: 10.1016/0031-9422(79)80098-9.
- Salimi, V., Maroufi, A. and Majdi, M. (2018) 'Differential expression of β -HSD and mlncRNAs in response to abiotic stresses in *Digitalis nervosa*', *Cellular and Molecular Biology*.
- Sauer, H. H., Bennett, R. D. and Heftmann, E. (1967) 'Pregnenolone metabolism in *Digitalis lanata*', *Phytochemistry*, 6(11), pp. 1521–1526. doi: 10.1016/S0031-9422(00)82945-3.
- Schaller, H. (2004) 'New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants', *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 42(6), pp. 465–476. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2004.05.012.
- Schneider, J. J. (1970) 'Metabolism of dehydroisoandrosterone and other steroids by surviving slices of the potato tuber and additional plant tissues.', *Journal of Biological Chemistry*, 245(20), pp. 5505–5510.
- Setchell, K. D. R. and Cassidy, A. (1999) Symposium on Phytochemicals: Biochemistry and Physiology Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health 1. Available at: <https://academic.oup.com/jn/article/129/3/758S/4722179>.
- Simerský, R. *et al.* (2009) 'Identification and quantification of several mammalian steroid hormones in plants by UPLC-MS/MS', *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(2), pp. 125–136. doi: 10.1007/s00344-009-9081-z.
- Simons, R. G. and Grinwich, D. L. (1989) 'Immunoreactive detection of four mammalian steroids in plants', *Canadian Journal of Botany*, 67(2), pp. 288–296. doi: 10.1139/b89-042.
- Sonawane, P. D. *et al.* (2016) 'Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism', *Nature Plants*, 3(December). doi: 10.1038/nplants.2016.205.
- Stohs, S. J. and El-Olemy, M. M. (1971) 'Pregnenolone and progesterone from 20α -hydroxycholesterol by *cheiranthus cheiri* leaf homogenates', *Phytochemistry*, 10(12), pp. 3053–3056. doi: 10.1016/S0031-9422(00)97350-3.
- Taiz, L. *et al.* (2017) 'Fisiologia e desenvolvimento vegetal'. Available at: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/books/9788582713679>.
- Tarkowská, D. (2019) 'Plants are capable of synthesizing animal steroid hormones', *Molecules*, 24(14), pp. 1–13. doi: 10.3390/molecules24142585.
- Tarkowská, D. and Strnad, M. (2018) 'Isoprenoid-derived plant signaling molecules: biosynthesis and biological importance', *Planta*, 247(5), pp. 1051–1066. doi: 10.1007/s00425-018-2878-x.
- Upadhyay, P. and Maier, C. (2016) 'Effects of 17β Estradiol on Growth, Primary Metabolism, Phenylpropanoid-Flavonoid Pathways and Pathogen Resistance in *Arabidopsis thaliana*', *American Journal of Plant Sciences*, 07(13), pp. 1693–1710. doi: 10.4236/ajps.2016.713160.
- Vriet, C., Eugenia, R. and Reuzeau, C. (2013) 'From Squalene to Brassinolide: The Steroid Metabolic and Signaling Pathways across the Plant Kingdom', *Molecular Plant*, 6(6), pp. 1738–1757. doi: 10.1093/MP/SST096.

- Waman, A. A., Bohra, P. and Sounderarajan, A. (2018) 'Propagule size affects yield and quality of *Curcuma mangga* Val. et Zijp.: An important medicinal spice', *Industrial Crops and Products*, 124, pp. 36–43. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.07.011.
- Wang, C. C., Prasain, J. K. and Barnes, S. (2002) 'Review of the methods used in the determination of phytoestrogens', *Journal of Chromatography B*, pp. 3–28. doi: 10.1080/10942912.2014.980946.
- Wilcoxon F (1945) Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics* 1:80–83
- Yagen, B., Gallili, G. E. and Mateles, R. I. (1978) 'Progesterone biotransformation by plant cell suspension cultures', *Applied and Environmental Microbiology*, 36(2), pp. 213–216. doi: 10.1128/aem.36.2.213-216.1978.
- Yang, X. H., Xu, Z. H. and Xue, H. W. (2005) 'Arabidopsis Membrane Steroid Binding Protein 1 is involved in inhibition of cell elongation', *The Plant Cell*, 17(1), pp. 116–131. doi: 10.1105/tpc.104.028381.
- Ylstra, B. *et al.* (1995) 'Steroid hormones stimulate germination and tube growth of in vitro matured tobacco pollen', *Plant Physiology*, 107(2), pp. 639–643. doi: 10.1104/pp.107.2.639.
- Young, I. J., Knights, B. A. and Hillman, J. R. (1977) 'Oestradiol and its biosynthesis in *Phaseolus vulgaris* L. [16]', *Nature*, p. 429. doi: 10.1038/267429a0.
- Zhang, J. *et al.* (2017) 'De novo sequencing and transcriptome analysis reveal key genes regulating steroid metabolism in leaves, roots, adventitious roots and calli of *Periploca sepium bunge*', *Frontiers in Plant Science*, 8(April), pp. 1–15. doi: 10.3389/fpls.2017.00594.
- Zhang, J. S., Yang, Z. H. and Tsao, T. H. (1991) 'The occurrence of estrogens in relation to reproductive processes in flowering plants', *Sexual Plant Reproduction*, 4(3), pp. 193–196. doi: 10.1007/BF00190004.

Informação Suplementar I: Estratégias de busca detalhadas.

Estratégias de busca:

Conceito	Termos livres	MeSH	GO	Palavras-chave:
Plant	Plant, Steroid Hormones, Steroid, Plant steroid, Phytosteroid,	Plants, Steroid Hormones, Steroid	Plant, Steroid Hormone, Steroid, Phytosteroid,	Plants, Plant, Steroid Hormone, Steroid, Phytosteroid,
Steroids	Mammalian sexual hormones, Estrone, Estrogen, Estrane, Estradiol, Progesterone, Testosterone, Androsterone, Androstenedione, Androgen,	Estrone Estrogen Estranes Estradiol Progesterone Testosterone Androsterone Androgens Androstenedione	Estrone Estrogen Estradiol Progesterone Testosterone Androsterone Androgen Androstenedione	Estrone Estrogen Estranes Estradiol Progesterone Testosterone Androsterone Androgens Androgen Androstenedione

Quadro SII: Quadro da elaboração de termos chaves para busca booleana. MeSH - Medical Subject Headings (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/>), GO - Gene Ontology (<http://geneontology.org/>).

Palavras-chave: Plants, Plant, Steroid Hormone, Steroid, Phytosteroid + Estrone, Estrogen, Estranes, Estradiol, Progesterone, Testosterone, Androsterone, Androgens, Androgen, Androstenedione.

Estratégias:

phytosteroid AND (estrone OR estrogen OR estranes OR estradiol)

phytosteroid AND Progesterone

phytosteroid AND (Androsterone OR Androgens OR Androgen OR Androstenedione)

(plant NEAR steroid) AND (estrone OR estrogen OR estranes OR estradiol)

(plant NEAR steroid) AND Progesterone

(plant NEAR steroid) AND (Androsterone OR Androgens OR Androgen OR Androstenedione)

(plant NEAR “steroid hormones”) AND (estrone OR estrogen OR estranes OR estradiol)

(plant NEAR “steroid hormones”) AND Progesterone

(plant NEAR “steroid hormones”) AND (Androsterone OR Androgens OR Androgen OR Androstenedione)

2. EVOLUÇÃO MOLECULAR DO RECEPTOR DE PROGESTERONA ASSOCIADO À MEMBRANA (MAPR) EM PLANTAS, UM ESTUDO INICIAL

RESUMO

A família gênica MAPR é proposta como sendo originada de um ancestral citocromo-b5 comum, as proteínas desta família possuem um domínio conservado Cytb5-HSb (*cytochrome b5-like heme/steroid-binding domain*). Estão presentes em diversos organismos eucariotes e estudos apontam três genes MAPR ancestrais que originaram os homólogos PGRMC (*progesterone receptor membrane component*), Neuferricina (NENF) e Neudesina (NEUFC), para opistocontes, entretanto poucos estudos debruçaram-se no estudo da presença destas no reino vegetal. As proteínas MAPR são das poucas candidatas conhecidas em plantas terrestres para receptor de progesterona. Este trabalho se propôs a avaliar as relações evolutivas da família gênica MAPR em plantas. A partir de testes com as quatro cópias descritas para *Arabidopsis thaliana*, foi selecionada a sequência at2g24940 (AtMAPR2) como isca para realizar um BLASTp nas bases de dados *Phytozome* e *Ensembl* em espécies representantes de algas vermelhas e de clados das Viridiplantae e Opistocontae. Os resultados das reconstruções filogenéticas revelam que entre as homologias desta família gênica, há divergências exclusivas dentro dos clados de plantas verdes. Apontam uma possível perda gênica de homólogos PGRMC em plantas, pois os homólogos de Viridiplantae encontram-se mais proximamente relacionados com os homólogos de NENF e NEUFC. Evidenciam que a divergência dos parálogos ancestrais NENF e NEUFC parece ser anterior à diversificação exclusiva que vemos nos homólogos vegetais que foram agrupados em Grupo A1, A2 (similares ao NENF) e B (similares ao NEUFC). A natureza bem conservada das sequências de aminoácidos desta família gênica indica um baixo acúmulo de variações e uma possível pressão seletiva para que os domínios sejam mantidos, assim como as funções. Mais estudos são necessários para que possamos compreender a natureza e funções destas proteínas de ligação à progesterona e outros esteroides em organismos vegetais.

ABSTRACT

The MAPR family is proposed to originate from a common cytochrome-b5 ancestor. The proteins in this family possess a conserved Cytb5-HSb (*cytochrome b5-like heme/steroid-binding domain*) domain. They are present in several eukaryotic organisms and studies point to three ancestral MAPR genes that originated the homologs PGRMC (*progesterone receptor membrane component*), Neuferricin (NENF) and Neudesin (NEUFC), for opistocons, however few studies have looked into their presence in the plant kingdom. MAPR proteins are among the few known candidates in land plants for progesterone receptor. This work was designed to evaluate the evolutionary relationships of the MAPR gene family in plants. From tests with the four copies described for *Arabidopsis thaliana*, the sequence at2g24940 (AtMAPR2) was selected as bait to perform a BLASTp on *Phytozome* and *Ensembl* databases on species representing red algae and clades of the Viridiplantae and Opistocontae. The results of the phylogenetic reconstructions reveal a deep homology among the proteins in this gene family and unique divergences within the green plant clades. The results point to a possible gene loss of PGRMC homologs in plants, as Viridiplantae homologs are more closely related to NENF and NEUFC homologs. The results also show that the divergence of the ancestral paralogs NENF and NEUFC seems to predate the unique diversification that we see in plant homologs that have been grouped into Group A1, A2 (similar to NENF) and B (similar to NEUFC). The well-conserved nature of the amino acid sequences in this gene family indicates low maintenance of mutations and possible selective pressure to maintain domains as well as functions. More studies are needed before we can understand the nature and functions of these steroid/progesterone binding proteins in plant organisms.

Figuras:

Figura 1: Pregnanos, alogregnanos e estranos selecionados, suas relações biossintéticas e seus possíveis precursores em plantas.

Figura 2: Relações filogenéticas e tempos de divergência estimados para as espécies estudadas gerados pela base de dados Timetree (Kumar et al. 2017). Cores à direita indicam

espécies pertencentes a Viridiplantae (verde), Opisthokontes: holomycota (roxo) e holozoa (azul), e as algas vermelhas (vermelho).

Figura 3: Reconstrução filogenética das proteínas MAPR em Viridiplantae e Opisthokonta. Abreviações das espécies estão de acordo com os materiais suplementares 1 e 2. A árvore foi gerada pelo método de máxima verossimilhança (ML) no servidor IQTree com 10.000.000 de réplicas de bootstrap. Cor verde dos ramos da árvore indicam homólogos de plantas terrestres e algas verdes, cor vermelha indica homólogos de algas vermelhas. Cores dos cladogramas (destaque) representam homólogos pertencentes aos três genes ancestrais descritos por Hehenberger *et al* (2020). Legenda: Azul claro: homólogos PGRMC; Azul escuro: homólogos NENF; Laranja: homólogos NEUFC;

Tabelas:

Tabela 1: Genes homólogos do agrupamento A1, de acordo com resultados apresentados na Figura 3 e Material Suplementar 3.

Tabela 2: Genes homólogos do agrupamento A2, de acordo com resultados apresentados na Figura 3 e Material Suplementar 3.

Tabela 3: Genes homólogos do agrupamento B, de acordo com resultados apresentados na Figura 3 e Material Suplementar 3.

Material Suplementar:

Material Suplementar 1: Sequências de homólogos de organismos Viridiplantae utilizadas nas análises resgatadas das bases de dados *Phytozome* e *EnsemblPlants*:

Material Suplementar 2: Sequências de homólogos de organismos Opisthokonta utilizadas nas análises resgatadas das bases de dados *EnsemblFungi* e *EnsemblMetazoa*.

Material Suplementar 3: Reconstrução filogenética das proteínas MAPR em diferentes Viridiplantae e Opisthokonta. Abreviações das espécies estão de acordo com os materiais suplementares 1 e 2. As árvores foram geradas pelo método de Inferência Bayesiana (BAY) no programa MrBayes 3.2 com 10.000.000 de gerações, amostradas a cada 500 gerações e *burn-in* de 25%.

Material Suplementar 4: Árvores Radiais **a.** Estimação de Máxima Verossimilhança (Figura 3) e **b.** Inferência Bayesiana (Material Suplementar 3). Legenda: Azul claro: homólogos PGRMC; Azul escuro: homólogos NENF; Laranja: homólogos NEUFC; Verde: homólogos de plantas verdes.

Lista de siglas:

Cyb5-HSb: Domínio conservado de ligação à esteroides similar ao citocromo b5 (*cytochrome b5-like heme/steroid-binding domain*)

MAPR: Receptor de progesterona associado à membrana (*membrane-associated progesterone receptor*)

MSBP: Proteína de membrana de ligação a esteroides (*membrane steroid binding protein*)

ML: Estimativa Máxima Verossimilhança (*maximum likelihood estimation*)

BAY: Inferência Bayesiana (*bayesian inference*)

2.1 INTRODUÇÃO*Pregnanos, alopregnanos e estranos em plantas*

Os esteroides desempenham papéis fundamentais na transmissão de sinais que mediam processos fisiológicos cruciais em diversos organismos eucariontes (Ferreira-Guerra *et al.*, 2020; Hehenberger *et al.*, 2020). Apesar de amplamente descritas em vertebrados e outros organismos, as rotas metabólicas dos esteroides Pregnanos, Alopregnanos e Estranos (Fig. 1) em plantas ainda não estão totalmente elucidadas (Kreis e Müller-Uri, 2010). Há evidências de que a pregnenolona, precursora da progesterona em vegetais, possa ser formada a partir dos seguintes precursores esteróis: campesterol, sitosterol, colesterol, stigmasterol ou lanosterol (Fig. 1) (Ginzberg, Tokuhisa e Veilleux, 2009; Ohyama *et al.*, 2009; Kreis e Müller-Uri, 2010; Zhang *et al.*, 2017; Tarkowská, 2019).

Diversos trabalhos demonstraram a presença e a ação fisiológica, em espécies vegetais, da progesterona e seus derivados alopregnanos e estranos. Alguns estudos reúnem evidências de que diversos passos chave do metabolismo destas substâncias estão presentes em tecidos vegetais e algumas enzimas envolvidas na sua biossíntese foram identificadas. O conhecimento sobre a origem de pregnanos, alopregnanos e estranos em plantas ainda possui algumas lacunas. Assume-se que a rota de biossíntese destes esteroides é similar à de mamíferos e outros vertebrados nas quais a pregnenolona é precursora da progesterona e ambas são precursoras de alopregnanos e estranos, ademais, diversas reações finais da síntese de testosterona e progesterona em tecidos vegetais foram demonstradas (Lindemann, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Tarkowská, 2019).

A partir das evidências reunidas em diversas décadas de estudo, vem se desvendando pistas da participação destes esteroides na regulação de diversos processos fisiológicos de desenvolvimento e adaptação em plantas. Como, por exemplo, a ação

estimulante da progesterona no crescimento em estágios iniciais de plântulas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh quando aplicada em baixas concentrações, e a supressão do crescimento em altas concentrações (Iino *et al.*, 2007). Também há evidências de que a progesterona e outros esteroides induzam alterações no conteúdo de componentes inorgânicos como potássio, cloro, manganês e ferro, a partir de aplicações exógenas (Erdal e Dumlupinar, 2011a). A aplicação de progesterona exógena também induziu o florescimento de variedades de trigo de inverno e *A. thaliana*, diminuindo o tempo de vernalização médio (exposição de plantas a fotoperíodos longos, requeridos normalmente para o florescimento destas espécies)(Janeczko e Filek, 2002). E por fim, a ação estimulante da aplicação exógena de progesterona e outros esteroides na atividade de enzimas citoprotetoras antioxidativas como a catalase, indicando um possível papel na resposta à estresses ambientais (Erdal e Dumlupinar, 2011b). Mais recentemente, foi demonstrado que a progesterona estimula a respiração celular e acelera a germinação das sementes graças à ativação de vias relacionadas à respiração mitocondrial (Turk 2021).

Janeczko e colaboradores (2013) identificaram, em variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.), proteínas de ligação de progesterona no citosol e na membrana plasmática. Além disso, detectaram mudanças no número e distribuição destas proteínas em células vegetais em resposta ao estresse de seca: na variedade sensível à seca, o número das proteínas de ligação à progesterona localizados nas membranas intracelulares e plasmática aumentou significativamente, enquanto na variedade resistente não houve alterações nas membranas. Com relação às proteínas de ligação citoplasmáticas, seu número aumentou na variedade resistente, mantendo-se estável na variedade sensível. Os autores concluíram que as mudanças ambientais são refletidas nas mudanças nas concentrações das proteínas de ligação de esteroides, e que estes estão provavelmente envolvidos na regulação de metabolismos celulares de resposta ao estresse de seca (Janeczko *et al.*, 2013). Algumas outras pistas da interação destes esteroides com diversos processos fisiológicos de desenvolvimento e adaptação em plantas em diferentes condições ambientais vem sendo desvendadas, e alguns autores conjecturam que a progesterona pode ter papel importante na sinalização celular (Janeczko e Skoczowski, 2002; Iino *et al.*, 2007; Janeczko, 2012; Tarkowská, 2019).

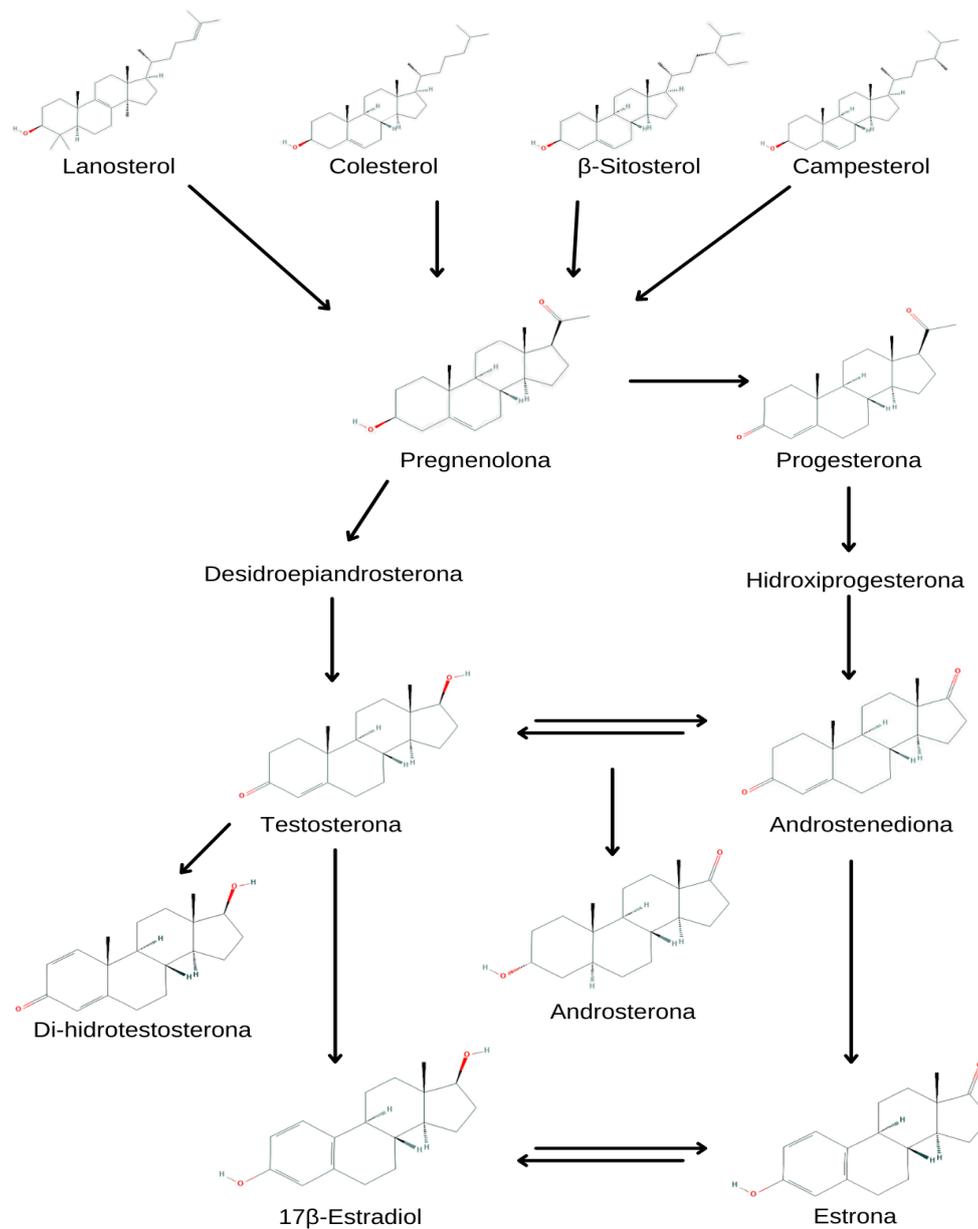


Figura 1. Representação esquemática de alguns pregnanos, alogregnanos e estranos presentes em organismos vegetais, suas relações biossintéticas e seus possíveis precursores em plantas. A pregnenolona, em vegetais, pode ser formada a partir dos seguintes precursores esteróis: campesterol, sitosterol, colesterol, stigmasterol ou lanosterol. A pregnenolona (C21) é a substância precursora da progesterona (C21) e dos esteroides andrógenos (C19) e estrógenos (C18) que se interligam biossinteticamente. Fonte: Adaptado de (Hartmann, Lacorn e Steinhart, 1998; Janeczko e Skoczowski, 2005; Ginzberg, Tokuhisa e Veilleux, 2009; Lindemann, 2015; Zhang et al., 2017; Tarkowská, 2019).

Receptores e proteínas de ligação

Os componentes para a transdução de sinais podem ser divididos em dois grupos de proteínas: Enzimas que são responsáveis pela biossíntese de moléculas sinalizadoras ou hormônios; e proteínas que são responsáveis pela percepção dos hormônios ou receptores celulares. Nos últimos anos uma boa parte dos estudos com relação a esteroides derivados de pregnanos em plantas está focado em trabalhos a respeito das enzimas chave da biossíntese. Entretanto, os receptores e proteínas que podem se ligar a estes esteroides ainda são majoritariamente desconhecidos (Iino *et al.*, 2007; Janeczko *et al.*, 2015; Tarkowska 2019).

No que se refere aos animais, há evidências de que os hormônios esteroides, como a progesterona, andrógenos e estrógenos, sinalizem através de membros da superfamília de proteínas receptoras nucleares (NR) (Weikum, Liu e Ortlund, 2018). Um novo modelo de conjunto conformacional de receptor para diversos esteroides e mediado por receptores ligados a outras membranas celulares (não-nucleares), foi sugerido. Este tipo de sinalização não é bloqueada por inibidores transcricionais e é descrita como "ações não-genômicas" (*non-genomic actions*) de esteroides (Norman, Mizwicki e Norman, 2004; Kao *et al.*, 2005). Pouco é conhecido para receptores nucleares ou não, de progesterona em plantas e alguns autores consideram a hipótese de que as respostas fisiológicas e/ou transcricionais desencadeadas por este esteroide são provavelmente mediadas por mecanismos citoplasmáticos alternativos (Milanesi e Boland, 2004; Yang, Xu e Xue, 2005).

Alguns autores identificaram, em espécies vegetais, genes homólogos aos que codificam proteínas de ligação a esteroides associadas a ações não-genômicas e que são encontradas tanto no citoplasma como associadas a membranas plasmáticas celulares (Kao *et al.*, 2005; Yang, Xu e Xue, 2005). Estas proteínas compartilham entre si um domínio conservado de ligação à esteroides similar ao citocromo b5 (*cytochrome b5-like heme/steroid-binding domain*) e regiões N terminais conservadas de ligação à membranas em comum com diversos organismos eucariotos (Cahill, 2017), constituindo a família de proteínas MAPR (*Membrane-Associated Progesterone Receptor*) (Ohta e Itoh 2012), que possuem propriedades fisiológicas multifuncionais (pleiotrópicas) relacionadas à biossíntese de colesterol e esteroides, metabolismo energético, regulação do ciclo celular, processos de autofagia e apoptose, migração celular, funções neurais, entre outras (Ryu, Klein e Zanger, 2017).

Yang *et al.* (2005) levantam evidências de que a proteína MSBP1 (*Membrane Steroid Binding Protein*) de *A. thaliana*, que compartilha este domínio conservado com outras proteínas MAPR de opistocontes (Mifsud e Bateman, 2002) e que se liga com alta afinidade à

progesterona, atua como mediador de ligação de alta afinidade com hormônios esteroides e pode ser responsável por respostas rápidas não-genômicas (Yang, Xu e Xue, 2005). Guo *et al.* (2009) mapearam a expressão gênica do homólogo MSBP1 em variedades de cevada (*Hordeum vulgare* L.) tolerantes e sensíveis ao estresse por deficit hídrico. Os autores observaram que este gene é abundantemente expresso nas duas variedades tolerantes à seca comparado à expressão na variedade sensível, tanto em condições hídricas normais, quanto de estresse de seca induzido, o que indica que este gene pode ter uma maior expressão constitutiva nas variedades resistentes.

Zenda *et al.* ao estudar a proteômica comparativa entre variedades de milho (*Zea mays* L.) resistentes e sensíveis à seca, identificaram uma regulação positiva de MSBP1, em resposta a tratamento de insuficiência hídrica (Zenda *et al.*, 2018). Além disso, evidências apontam para uma possível relação de MSBP1 com a regulação da sinalização de brassinosteróides (acelera a endocitose de receptores BAK1, responsável pela endocitose de BRI1), que têm papel crucial em diversos processos de crescimento, diferenciação celular e tolerância a estresses bióticos e abióticos (Song *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2011; Gruszka, 2018).

MAPR em Viridiplantae

Kao *et al.* (2005), utilizando como isca (BLAST) as sequências de aminoácidos das proteínas de ligação de progesterona associadas às membranas plasmática e intracelulares de vertebrados 25-Dx/IZAg/Hpr6.6 e que possuem os domínios conservados característicos das MAPR, identificaram quatro homólogos (M)SBPs putativos em *A. thaliana*: at2g24940 (AtMAPR2), at3g48890 (AtMAPR3), at4g14965 (AtMAPR4), at5g52240 (AtMAPR5 ou MSBP1). Apesar de suas funções ainda não estarem totalmente elucidadas, os autores sugeriram estas como integrantes da família proteica MAPR, a partir de suas similaridades, majoritariamente na região média das sequências, onde encontra-se o domínio conservado de ligação à esteroides, e nas regiões N-terminais codificando possível aderência à membranas (exceto por atMAPR2 que provavelmente tem papel de proteína livre solúvel) (Kao *et al.*, 2005). Análises de sequência demonstraram que MAPR possui um domínio conservado similar ao citocromo b5, *Cyb5-HSb*. Do ponto de vista evolutivo, autores sugerem que este domínio conservado *Cyb5-HSb*, pode ter sua origem a partir de um citocromo ancestral que foi modelo de sítio de ligação à esteroides (Mifsud e Bateman, 2002; Kao *et al.*, 2005).

Yang *et al.* (2005) dedicaram-se à elucidação da proteína codificada por MSBP1, que é sinônimo do AtMAPR5, citado anteriormente. Os autores demonstraram que este gene codifica uma proteína de ligação de esteroides localizada na membrana plasmática e se liga

com alta afinidade à progesterona e menor afinidade com outros esteroides, em ordem: 5-dihidrotestosterona, 24-epi-brassinolideo e stigmasterol (Yang, Xu e Xue, 2005).

Iino *et al.* (2007) identificaram genes homólogos às proteínas de ligação de progesterona humanas da mesma família (HPR6.6) em *A. thaliana*, nomeando-as: SBP, MSBP1 e MSBP2; e em *Oryza sativa* L.: osSBP, osMSBP1 e osMSBP2. Neste trabalho os autores investigaram a expressão desses genes em diferentes órgãos vegetais demonstrando que os genes são expressos tanto em órgãos vegetativos quanto reprodutivos. A expressão de MSBP1 e MSBP2 foi similar em todos os tecidos. No entanto, o gene SBP, que codifica uma proteína solúvel (não ancorada às membranas celulares) em *A. thaliana*, demonstrou expressão diferente, sendo mais expresso nas inflorescências e folhas, o que indica que pode ter funções distintas das proteínas de membrana (Iino *et al.*, 2007). Em síntese dos resultados descritos por estes autores, nesta família putativa em *A. thaliana* e *O. sativa*, os autores identificaram entre 2-3 genes com regiões N-terminais de aderência a membranas e um gene que codifica uma proteína que não se adere à membrana, todos apresentando o domínio conservado Cyb5-HSb que apresenta um sítio de ligação da progesterona e outros esteroides.

As proteínas utilizadas como iscas dos BLAST nestes trabalhos de Kao *et al* (2005), Yang *et al* (2005) e Iino *et al* (2007), mencionados anteriormente, pertencem à família de proteínas MAPR. Existe um esforço de pesquisas para reconstruir as relações filogenéticas e caminhos evolutivos desta família de proteínas, que compartilham este domínio com proteínas de ligação de progesterona de membrana putativas de leveduras (Dap1p e AL133225), moscas de fruta (AY061163 e NM135806), e ratos (25- Dx, Nenf e Pgrmc2) (Iino *et al.*, 2007). Desta forma, diversos estudos se debruçaram sobre os caminhos evolutivos do surgimento, duplicações e divergências da família MAPR, e tentam atualmente traçar suas origens, levando em conta sequências de organismos não-bilaterais e opistocontes em suas reconstruções filogenéticas (Smith, Mark Welch e Snell, 2011; Cahill, 2017; Ren *et al.*, 2019; Hehenberger *et al.*, 2020).

Mifsud, e Bateman, (2002) hipotetizam que o domínio Cyb5-HSb pode ter servido como *template* para evoluções mais recentes de novos sítios de ligação (ao ligante) como os sítios de ligação presentes em MAPR. Ademais, três genes MAPR ancestrais, PGRMC (*progesterone receptor membrane component*), Neuferricina (NENF) e Neudesina (NEUFC), foram identificados em opistocontes (Hehenberger *et al.*, 2020). As evidências apontam que todos os três já estavam presentes no ancestral comum de opistocontes (animais, fungos e táxons unicelulares relacionados), e hipotetiza-se que a divergência que originou os ancestrais NENF e NEUFC se deu mais recentemente em relação ao PGRMC (Ryu, Klein e Zanger,

2017; Hehenberger *et al.*, 2020). Entretanto, estes estudos tiveram como foco os vertebrados, e os homólogos presentes em plantas terrestres não foram inseridos nas análises filogenéticas. Até o momento, as possibilidades evolutivas desta família de proteínas homólogas identificados em organismos vegetais ainda foi pouco explorada.

Considerando que estas proteínas de ligação a esteroides putativas são um dos poucos candidatos conhecidos em plantas terrestres e único com maior afinidade para com a progesterona, este trabalho se propôs a recuperar sequências dos homólogos MAPR em indivíduos representativos de *Viridiplantae* (plantas verdes) e de *Opisthokonta*, para a comparação, e realizar reconstruções filogenéticas utilizando o método de máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BAY), a fim de realizar uma análise prévia da evolução molecular da família gênica e as relações de seus membros com os homólogos de vertebrados e outros opistocontes. A identificação destes homólogos de plantas verdes e a desvelação de sua relação evolutiva com homólogos de outros organismos é um primeiro passo para posteriormente identificar processos e eventos evolutivos de perda e ganho de genes entre as linhagens de plantas, variação esta que pode ter consequências funcionais relevantes e dar pistas de adaptação a ambientes particulares (Ames *et al.*, 2012).

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção dos dados

Para estimar os níveis de variação e a seleção da (as) iscas mais adequadas para realizar a recuperação das sequências, inicialmente realizamos um BLASTp utilizando as quatro sequências CDS e aminoácidos dos genes descritos por Kao *et al* (2005) em *A. thaliana* (L.) Heynh.: at2g24940 (AtMAPR2), at3g48890 (AtMAPR3), at4g14965 (AtMAPR4), at5g52240 (AtMAPR5), contra o genoma de *A. thaliana*, e espécies representativas dos grandes grupos de *Viridiplantae* (*Chlorophyta*, *Marchantiophyta*, *Bryophyta*, *Pinophyta*, *Magnoliophyta*) no banco de dados de genomas de plantas *Phytozome* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Recuperamos as sequências homólogas resultantes da pesquisa e os resultados foram tabulados para observação dos valores estatísticos de *E-value*. Todas as cópias CDS e peptídicas das sequências encontradas foram salvas em formato fasta. A partir deste teste inicial, pôde-se observar que no geral todas as cópias recuperavam as mesmas sequências nos diferentes organismos, exceto quando a sequência do gene AtMAPR2 foi utilizada como isca, e uma cópia a mais foi recuperada em algumas algas, todas com *E-value* acima de 1^{-10} . Também observamos que todas as sequências recuperadas apresentavam

o domínio conservado. Dados estes resultados, a sequência de aminoácidos do gene AtMAPR2 foi selecionada para ser utilizada como isca nas buscas subsequentes.

Para a reconstrução filogenética nós selecionamos pelo menos um organismo representativo das diferentes linhagens evolutivas de Viridiplantae: *Chlorophyta*, *Charophyta*, *Marchantiophyta*, *Bryophyta*, *Lycophyte*, *Monilopyta*, *Pinophyta*, *Magnoliophyta* basal, *Monocotiledônea*, *Eudicotiledônea* (basal, Rosídeas e Asterídeas). Amostramos também organismos representantes de *Rhodophyta*, de maneira aleatória dentre as sequências genômicas disponíveis na base de dados Phytozome e Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>) (Mat. Suplementar 1).

Nós também incluímos neste trabalho as sequências dos genes de espécies de opistocontes. Para isso, selecionamos pelo menos um organismo representativo de cada grupo com base no trabalho de Hehenberger *et al.* (2020): vertebrados; cordados basais; *arthropoda*; *nematoda*; *annelida*; *mollusca*; *cnidaria*; *ctenophora*; *placozoa*; *Fungi*: basal, *ascomycota*, *basidiomycota*; de maneira aleatória dentre as sequências genômicas disponíveis nas bases de dados Ensembl Metazoa (<https://metazoa.ensembl.org/index.html>) e Ensembl Fungi. (<http://fungi.ensembl.org/index.html>). No total foram amostradas 48 espécies, sendo 22 espécies representantes de plantas verdes e algas vermelhas e 26 espécies representantes de opistocontes (Material Suplementar 2). Uma ilustração das relações filogenéticas entre as espécies estudadas, disponível na Figura 2, foi gerada a partir das informações da base de dados Timetree (Kumar et al, 2017).

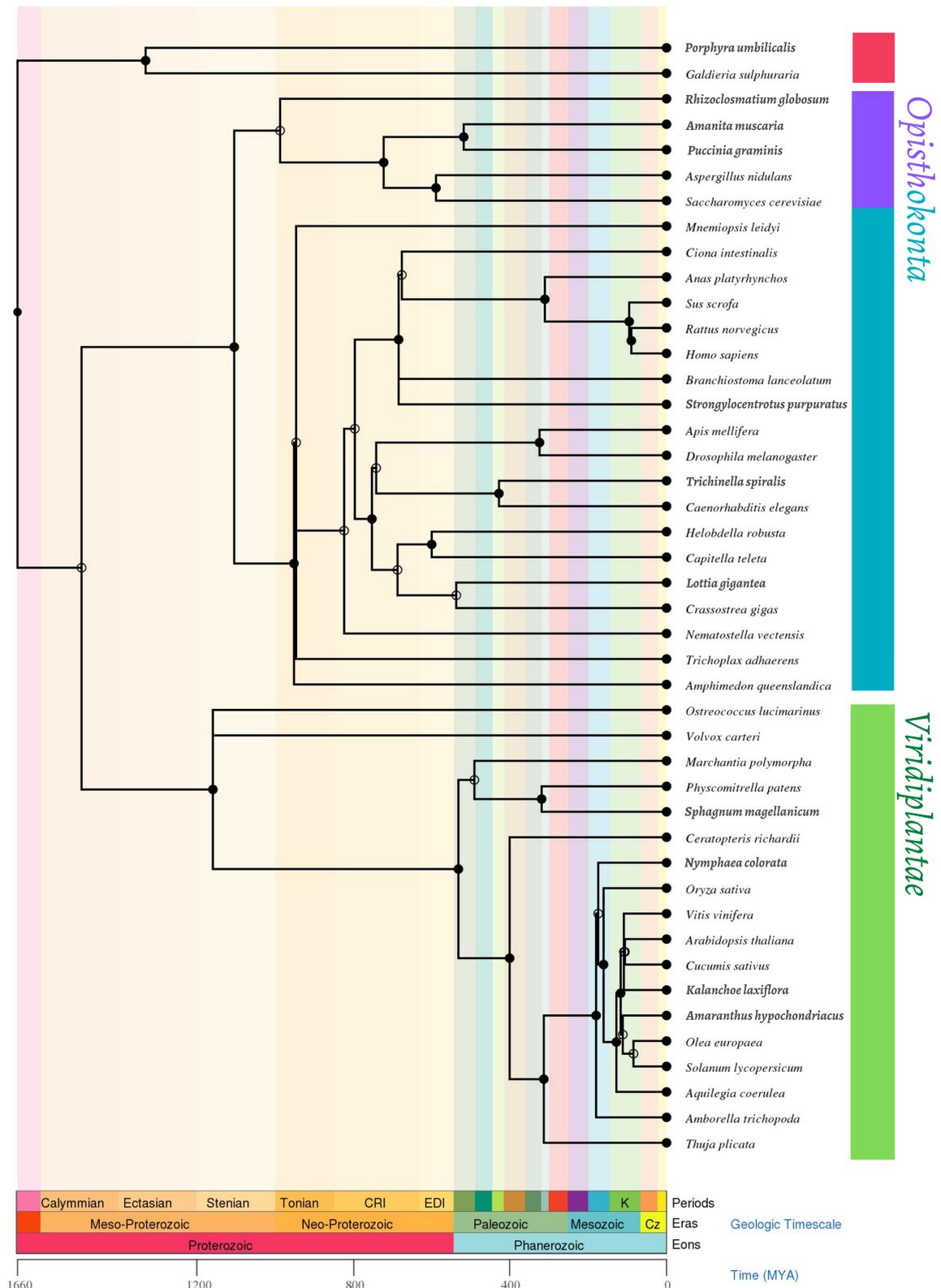


Figura 2: Relações filogenéticas e tempos de divergência estimados para as espécies estudadas gerados pela base de dados Timetree (Kumar et al. 2017). Cores à direita indicam espécies pertencentes a Viridiplantae (verde), Opisthokontes: holomycota (roxo) e holozoa (azul), e as algas vermelhas (vermelho).

Realizamos os BlastP contra genomas dos organismos selecionados, sem alterar os parâmetros padrão das bases de dados e utilizando como isca a sequência de aminoácidos de AtMAPR2. Recuperamos as sequências CDS dos genes que apresentaram $E\text{-value} < 1e^{-10}$. Organizamos as informações em tabelas compartilhadas no servidor Google Sheets, que incluíam: código de acesso, outros nomes, $e\text{-value}$, $score$, tamanho da proteína, domínios e localização. Ao encontrar cópias alternativas do mesmo gene, levamos em conta só os transcritos primários. As sequências codificantes (CDS) foram salvas em formato fasta.

2.2.2 Tratamento, análise e alinhamento múltiplo de sequências

As sequências foram inspecionadas no programa MEGA 7.0 (Kumar, Glen e Koichiro, 2016), quando houve sequências de notação parcial, repetimos o BLASTp contra o genoma do mesmo organismo na base de dados do NCBI e resgatamos as sequências completas, quando devidamente anotadas. Por fim, resgatamos 168 sequências de 48 espécies, 22 de plantas verdes e algas vermelhas e 26 espécies de opistocontes. O programa MEGA também foi utilizado para realizar o alinhamento múltiplo de sequências utilizando o algoritmo *Muscle* considerando os códons. Após a conferência, submetemos os alinhamentos no servidor G-blocks v.0.91b (Castresana, 2000), que sugere blocos e regiões (domínios) mais conservadas para análise filogenética selecionando as definições menos estridentes. Salvamos o alinhamento final em formato fasta e inspecionamos novamente no programa MEGA para a presença de “stop códons” possivelmente derivados de artefatos do alinhamento. Utilizamos o bloco de notas para editar eventuais *gaps*, que foram poucos e pouco regulares e não foram considerados nas análises para evitar que os programas superestimassem os eventos de deleção.

2.2.3 Seleção de modelo evolutivo e reconstrução filogenética

Submetemos o alinhamento de aminoácidos codificado ao programa de teste de seleção de modelos evolutivos de aminoácidos ProtTest 3.4.2 (Darriba *et al.*, 2011) e o modelo com menor resíduo (-LnL) foi LG (Le e Gascuel, 2008) com os parâmetros +G (gama discreto) e +I (proporção de sítios invariáveis), para calcular a heterogeneidade das taxas de mutação (Gu, Fu e Li, 1995).

O alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos foi aplicado para construção da árvore filogenética utilizando o método de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood estimation* ML), utilizando o teste *ultrafast bootstrap* (Minh, Nguyen e von Haeseler, 2013) no servidor web IQTree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) com 10.000 cadeias

MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*). Para fins de comparação, realizamos também uma análise de inferência bayesiana (*bayesian inference* - BAY) no programa MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012), com 10.000.000 gerações, amostradas a cada 500 gerações. Para gerar a árvore consenso, utilizamos o *burn-in* de 25%. Os modelos e parâmetros foram fixados nas análises de acordo com os melhores resultados sugeridos pelos programas de seleção de modelo evolutivo de aa acima citados. Utilizamos o programa Tracer v.1.7.2 (Rambaut *et al.*, 2018) para conferir a qualidade dos resultados a partir dos valores de ESS (*Effective Sample Size*) maior que 200. As primeiras 5.000 gerações foram descartadas como *burn-in* e a árvore consenso foi examinada no programa FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2012).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Identificação de genes MAPR em diferentes linhagens de plantas

Para abordar os processos envolvidos na evolução das proteínas MAPR em plantas, nós realizamos uma pesquisa nos bancos de dados genômicos de 20 espécies de Viridiplantae, incluindo: *Ostreococcus lucimarinus* e *Volvox carteri* (Chlorophyta); *Chara braunii* (Charales); *Marchantia polymorpha* (Marchantiophyta); *Physcomitrium patens* e *Sphagnum magellanicum* (Bryophyta); *Selaginella moellendorffi* (Lycopphyta); *Ceratopteris richardii* (Monilophyta); *Thuja plicata* Donn ex D.Don (Acrogymnospermae); *Nymphaea colorata* Peter e *Amborella trichopoda* Baill. (Magnoliophyta basal); *Oryza sativa* L. (Monocotiledônea); *Aquilegia coerulea* E.James (Eudicotiledônea basal, Ranunculales); *Kalanchoe laxiflora* Baker e *Amaranthus hypochondriacus* L. (Eudicotiledônea, Caryophyllales); *Solanum lycopersicum* L. e *Olea europaea* L. (Eudicotiledônea, Asteridea); *Vitis vinifera* L., *Cucumis sativus* L. e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Eudicotiledônea, Rosidea); bem como duas espécies de Rhodophyta, *Porphyra umbilicalis* e *Galdieria sulfuraria*. O número de parálogos variou entre as espécies de Viridiplantae (3-10), sendo a espécie *Olea europaea* a que apresentou o maior número de parálogos (10), seguida por *Kalanchoe laxiflora* (8) e *Thuja plicata* (7) (Material Suplementar 1). O menor número de cópias foi observado nas espécies de Rhodophyta (2) seguido das plantas verdes *Volvox carteri* (3), *Marchantia polymorpha* (3), *Ceratopteris richardii* (3), *Aquilegia coerulea* (3); *Vitis vinifera* (3).

As análises apontaram para diversas sequências idênticas: Smo1 e Atr3 de *Selaginella moellendorffi* Hieron. e *Amborella trichopoda* Baill.; Smo2 e Smo3 de *S. moellendorffi*; Kla3 e Kla4, Kla5 e Kla6 de *K. laxiflora*; e Oeu1, Oeu2 e Oeu3 de *O.*

europaeae. Este fenômeno pode estar indicando uma pressão seletiva forte para a manutenção destes domínios de ligação, além de poder sugerir, também, duplicações recentes que não tiveram tempo para acumular mutações. Estes resultados ainda são muito incipientes para rejeitar ou aceitar as hipóteses, mas podem servir para termos um panorama inicial sobre possíveis processos que permeiam a evolução destes genes. Os resultados sugerem as essas proteínas estão presentes em todas as linhagens de plantas.

2.3.2 Análise filogenética das proteínas MAPR

Os resultados da reconstrução filogenética utilizando o método de ML indicam que os homólogos das proteínas MAPR em plantas se encontram divididos majoritariamente em pelo menos três agrupamentos distintos. O resultado da análise filogenética (Fig. 3) aponta uma duplicação e divergência ancestral que originou os PGRMC dos eumetazoários (incluindo genes homólogos humanos, de insetos e de cnidários). Aponta também uma duplicação posterior que origina dois grupos divergentes de homólogos onde estão inseridos genes NEUFC e NENF de organismos eumetazoários.

Nas plantas, os genes estão presentes nestes dois agrupamentos de divergência mais recente, e em ambos, a árvore indica divergências exclusivas de organismos vegetais que inclui genes de *Charophyta* e plantas terrestres, configurando um ramo de homólogos NENF (Grupo A) com uma maior diversificação e outro de homólogos NEUFC (Grupo B), relativamente menor, detalhados a seguir:

Grupo A ou Homólogos NENF-like

Os resultados indicam uma grande diversificação neste agrupamento que concentrou mais parálogos dentro dos genomas das espécies vegetais. A árvore filogenética (Fig. 3) indica uma provável duplicação antiga que deu origem a dois subgrupos divergentes dentro deste agrupamento: A1 e A2.

Estão presentes no subgrupo A1, genes de todos os clados das plantas representados na análise, exceto algas verdes (*Chlorophyta* e *Charophyta*) e vermelhas (*Rhodophyta*). Chama atenção que seis dos sete parálogos de *T. plicata* (*Acrogymnospermae*) se encontram neste agrupamento, assim como quatro dos dez parálogos de *O. europaeae* (*Asteríidea*). Entretanto, apenas um dos seis parálogos de *Oryza sativa* (*Monocotiledônea*) encontra-se em A1. Neste agrupamento também se encontra o gene Ath2 de *A. thaliana*, utilizado como isca no resgate de sequências (Tab. 1).

Quanto ao subgrupo A2, assim como o anterior, abarca pelo menos um homólogo presente de cada clado estudado a partir de, pelo menos, *Marchantiophyta*, exceto pelas algas verdes e vermelhas (Tab. 2). Nas *Caryophyllales* estudadas, quatro de seis parálogos de *K. laxiflora* e três de quatro parálogos de *Amaranthus hypochondriacus* L. estão neste agrupamento. Em *O. sativa*, quatro dos seis parálogos encontram-se neste agrupamento. Chamo atenção, também, que a maioria dos parálogos (entre 3 e 4) das espécies de briófitas estudadas, *Physcomitrium patens* (Hedw.) Mitt. e *Sphagnum magellanicum* Brid., está neste agrupamento. Entretanto, somente um dos sete parálogos de *T. plicata* foi inserido neste clado. Aqui também se encontram os parálogos de *A. thaliana*, Ath5 e Ath3, também conhecidos como MSBP1 e MSBP2 respectivamente.

Grupo B ou Homólogos NEUFC-like

Este grupo possui uma menor diversidade comparada aos agrupamentos anteriores, e um menor número de parálogos nas espécies estudadas. Os resultados indicam que possa estar presente de algas vermelhas até Monocotiledônea, rosídeas e asterídeas, apresentando maior número de parálogos (2) nas espécies de Bryophyta e Caryophyllale estudadas. Ademais, parece estar ausente na *Acrogymnosperma* estudada, *T. plicata* (Tab. 3). O gene Ath4 de *A. thaliana* encontra-se neste grupo.

Algas (*Rhodophyta*, *Charophyta* e *Chlorophyta*)

Dentre as algas *Rhodophyta* (algas vermelhas) e *Chlorophyta* (algas verdes), alguns homólogos das espécies estudadas estão incluídos no grupo dos homólogos NEUFC, apesar de fora do grupo específico B, sendo os genes homólogos Gsu2 e Pum2, das algas vermelhas *Galdieria sulphuraria* e *Porphyra umbilicalis* respectivamente, mais proximamente relacionados dos homólogos NEUFC de eumetazoários. Os três homólogos presentes na alga verde *Chlorophyta*, *Volvox carteri* f. *hazeni* (J.Metzner) H.Nozaki, encontram-se neste agrupamento, Vca1 e Vca2 mais relacionados aos homólogos de fungos e Vca3, relacionado com os genes de insetos FFLY3 e APIS2, de *Drosophila melanogaster* (mosca de fruta) e de *Apis mellifera* (abelha europeia) respectivamente.

Os outros dois homólogos de algas vermelhas, Gsu1 e Pum1 localizam-se em um ramo à parte na topologia da árvore, entre os homólogos PGRMC e NENF estão relacionados mais proximamente ao gene FFLY4 de *Drosophila melanogaster*.

Os resultados gerados pela análise de BAY (Material Suplementar 3) foram congruentes com o padrão geral observado na árvore de ML, com algumas diferenças

pontuais. Estas diferenças se dão majoritariamente pelo fato de que a topologia da árvore de BAY retornou várias relações não resolvidas entre genes, resultando em politomias. Isto pode ter se dado pela natureza bem conservada das sequências de aminoácidos desta família gênica e pode indicar um baixo acúmulo de variações/mutações. No entanto, os resultados corroboram os agrupamentos identificados nos resultados da ML e descritos anteriormente (Tab. 1-3).

Uma das diferenças entre os resultados das análises, com relação ao Grupo A, é a relação deste com os homólogos opistocontes NENF e PGRMC que não ficou bem resolvida na BAY e resultou em uma politomia. Com relação aos genes que fazem parte deste grupo, somente uma divergência entre as duas metodologias foi observada para o gene Smo4 de *S. moellendorffi*, que na árvore BAY aparece fora dos dois subgrupos identificados 1 e 2, mas ainda inserido no Grupo A (Tab. 1).

Também houve uma pequena divergência entre as duas análises com relação aos genes da alga *V. carteri*, Vca1 e Vca2, indicados como integrantes do grupo B na árvore ML, e que na BAY a sua relação com os outros homólogos integrou a politomia e não ficou bem resolvida (Tab. 3). Quanto aos homólogos de algas vermelhas, Gsu1 e Pum1 que a ML indicou como relacionados mais proximamente ao gene de inseto, FFLY4, na árvore BAY integraram a politomia de relações não resolvidas também. Entretanto, é interessante destacar que esta análise corroborou com a relação de parentesco próximo entre Vca3, e os genes de insetos, FFLY3 e APIS2, apontadas pela ML. Ademais, os resultados desta análise corroboram com a topologia geral da árvore de ML (Tab. 1).

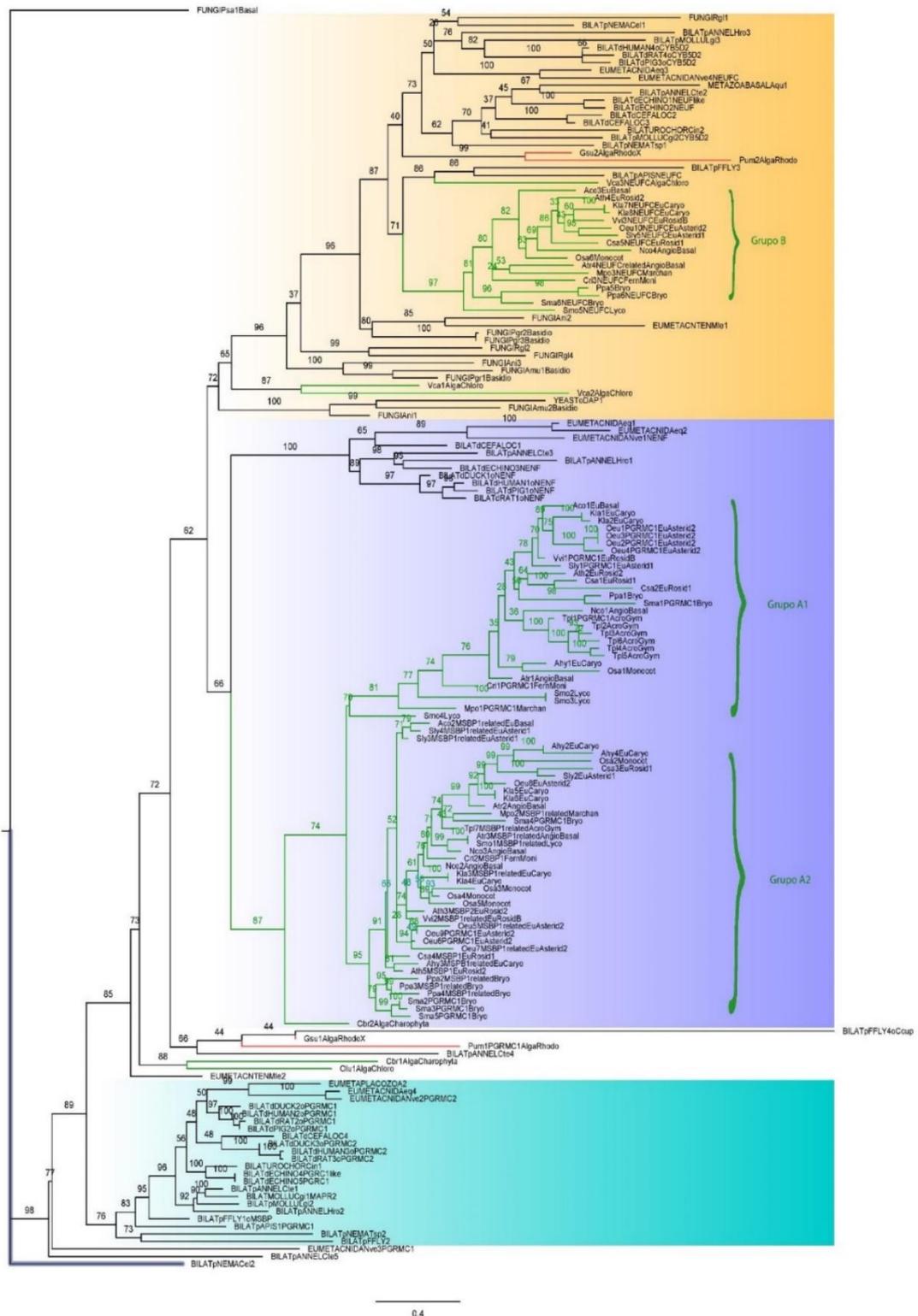


Figura 3: Reconstrução filogenética das proteínas MAPR em Viridiplantae e Opisthokonta. Abreviações das espécies estão de acordo com os materiais suplementares 1 e 2. A árvore foi gerada pelo método de máxima verossimilhança (ML) no servidor IQTree com 10.000.000 de réplicas de bootstrap. Cor verde dos ramos da árvore indicam homólogos de plantas terrestres e algas verdes, cor vermelha indica homólogos de algas. Cores dos clados (destaque) representam homólogos pertencentes aos três genes ancestrais descritos por Hehenberger et al (2020). Legenda: Azul claro: homólogos PGRMC; Azul escuro: homólogos NENF; Laranja: homólogos NEUFC. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 1: Tabela de genes homólogos do agrupamento A1, de acordo com resultados da ML (Figura 3) e BAY (Material Suplementar 3) Fonte: Elaborado pelo autor

Espécie	Código	Código (análises)	Gene	Clado/Filogenia
<i>Marchantia polymorpha</i>	Mpo1	Mpo1PGRMC1Marchan **	Mapoly0146s0039.1	Marchantiophyta
<i>Physcomitrium patens</i>	Ppa1	Ppa1Bryo **	Pp3c1_15400V3.1	Bryophyta
<i>Sphagnum magellanicum</i>	Sma1	Sma1PGRMC1Bryo **	Sphmag03G044500.1.p	Bryophyta
<i>Selaginella moellendorffi</i>	Smo2	Smo2Lyco **	272366(PAC:15403020)	Lycophyte
	Smo3	Smo3Lyco **	228191(PAC:15405464)	
	Smo4	Smo4Lyco*	58069(PAC:15404061)	
<i>Ceratopteris richardii</i>	Cri1	Cri1PGRMC1FernMoni **	Ceric.25G021300.1.p	Monilophyta (aquática)
<i>Thuja plicata</i>	Tpl1	Tpl1PGRMC1AcroGym **	Thupl.29379080s0005.1.p	Acrogymnospermae
	Tpl2	Tpl2AcroGym **	Thupl.29071727s0001.1.p	
	Tpl3	Tpl3AcroGym **	Thupl.29382101s0001.1.p	
	Tpl4	Tpl4AcroGym **	Thupl.29379080s0007.1.p	
	Tpl5	Tpl5AcroGym **	Thupl.28850574s0001.1.p	
	Tpl6	Tpl6AcroGym **	Thupl.29379882s0003.1.p	
<i>Nymphaea colorata</i>	Nco1	Nco1AngioBasal **	NC3G0228590.1	Nymphaeales/Magnoliophyta basal
<i>Amborella trichopoda</i>	Atr1	Atr1AngioBasal **	PAC:31572080	Amborellales/Magnoliophyta basal
<i>Oryza sativa</i>	Osa1	Osa1Monocot **	LOC_Os02g55060.1	Monocotiledônea
<i>Aquilegia coerulea</i>	Aco1	Aco1EuBasal **	Aqcoe7G347700.1.p	Eudicotiledônea basal
<i>Kalanchoe laxiflora</i>	Kla1	Kla1EuCaryo **	Kalax.0292s0024.1.p	Eudicotiledônea Caryophyllales
	Kla2	Kla2EuCaryo **	Kalax.0014s0136.1.p	
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Ahy1	Ahy1EuCaryo **	AH018995-RA	Eudicotiledônea Caryophyllales
<i>Solanum lycopersicum</i>	Sly1	Sly1PGRMC1EuAsterid1 **	Solyc08g029160.1.1	Eudicotiledônea Asteridea I
<i>Olea europaea</i>	Oeu1	Oeu1PGRMC1EuAsterid2 **	Oeu060654.1	Eudicotiledônea Asteridea II
	Oeu2	Oeu2PGRMC1EuAsterid2 **	Oeu048544.1	
	Oeu3	Oeu3PGRMC1EuAsterid2 **	Oeu048543.1	
	Oeu4	Oeu4PGRMC1EuAsterid2 **	Oeu006859.1	
<i>Vitis vinifera</i>	Vvi1	Vvi1PGRMC1EuRosidB **	VIT_204s0008g06870.1	Eudicotiledônea Rosidea basal
<i>Cucumis sativus</i>	Csa1	Csa1EuRosid1 **	Cucsa.162900.1	Eudicotiledônea Rosidea I
	Csa2	Csa2EuRosid1 **	Cucsa.162910.1	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ath2	Ath2EuRosid2 **	AT2G24940.1	Eudicotiledônea Rosidea II

** Sustentado pelos resultados da ML e BAY

*Sustentado pelos resultados da ML

Tabela 2: Tabela de genes homólogos do agrupamento A2, de acordo com resultados da ML (Figura 3) e BAY (Material Suplementar 3) Fonte: Elaborado pelo autor

Espécie	Código	Código (Análises)	Gene	Clado/Filogenia
<i>Marchantia polymorpha</i>	Mpo2	Mpo2MSBP1relatedMarchan **	Mapoly0033s0005.1	Marchantiophyta
<i>Physcomitrium patens</i>	Ppa2	Ppa2MSBP1relatedBryo **	Pp3c7_25400V3.1	Bryophyta
	Ppa3	Ppa3MSBP1relatedBryo **	Pp3c1_6930V3.1	
	Ppa4	Ppa4MSBP1relatedBryo **	Pp3c2_30040V3.1	
<i>Sphagnum magellanicum</i>	Sma2	Sma2PGRMC1Bryo **	Sphmag16G046200.1.p	Bryophyta
	Sma3	Sma3PGRMC1Bryo **	Sphmag17G075600.1.p	
	Sma4	Sma4PGRMC1Bryo **	Sphmag12G040100.1.p	
	Sma5	Sma5PGRMC1Bryo **	Sphmag19G064400.1.p	
<i>Selaginella moellendorffi</i>	Smo1	Smo1MSBP1relatedLycy **	19427(PAC:15403467)	Lycophyte
<i>Ceratopteris richardii</i>	Cri2	Cri2MSBP1FernMoni **	Ceric.18G079200.1.p	Monilophyta (aquática)
<i>Thuja plicata</i>	Tpl7	Tpl7MSBP1relatedAcroGym **	Thupl.29380711s0003.1.p	Acrogymnospermae
<i>Nymphaea colorata</i>	Nco2	Nco2AngioBasal **	NC1G0129340.1	Nymphaeales/Magnoliophyta basal
	Nco3	Nco3AngioBasal **	NC12G0095020.1	
<i>Amborella trichopoda</i>	Atr2	Atr2AngioBasal **	PAC:31558316	Amborellales/Magnoliophyta basal
	Atr3	Atr3MSBP1relatedAngioBasal **	PAC:31568685	
<i>Oryza sativa</i>	Osa2	Osa2Monocot **	LOC_Os03g20470.1	Monocotiledônea
	Osa3	Osa3Monocot **	LOC_Os10g35850.1	
	Osa4	Osa4Monocot **	LOC_Os10g35870.1	
	Osa5	Osa5Monocot **	LOC_Os02g42740.1	
<i>Aquilegia coerulea</i>	Aco2	Aco2MSBP1relatedEuBasal **	Aqcoe7G039800.1.p	Eudicotiledônea basal
<i>Kalanchoe laxiflora</i>	Kla3	Kla3MSBP1relatedEuCaryo **	Kalax.0519s0021.1.p	Eudicotiledônea Caryophyllales
	Kla4	Kla4EuCaryo **	Kalax.1877s0002.1.p	
	Kla5	Kla5EuCaryo **	Kalax.0195s0056.1.p	
	Kla6	Kla6EuCaryo **	Kalax.0178s0018.1.p	
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Ahy2	Ahy2EuCaryo **	AH016635-RA	Eudicotiledônea Caryophyllales
	Ahy3	Ahy3MSBP1relatedEuCaryo **	AH012375-RA	
	Ahy4	Ahy4EuCaryo **	AH019485-RA	
<i>Solanum lycopersicum</i>	Sly2	Sly2EuAsterid1 **	Solyc04g049790.3.1	Asteridea I
	Sly3	Sly3MSBP1relatedEuAsterid1 **	Solyc03g025950.4.1	
	Sly4	Sly4MSBP1relatedEuAsterid1 **	Solyc06g035870.3.1	
<i>Olea europaea</i>	Oeu5	Oeu5MSBP1relatedEuAsterid2 **	Oeu021780.1	Asteridea II
	Oeu6	Oeu6PGRMC1EuAsterid2 **	Oeu056242.1	

2.4 DISCUSSÃO

As árvores resultantes das reconstruções filogenéticas ML e BAY revelam uma forte homologia entre as sequências (Hehenberger *et al.*, 2020), indicam que os homólogos se encontram divididos majoritariamente em pelo menos três agrupamentos distintos. A topologia das ML corrobora com os resultados anteriores que sugerem os genes PGRMC, encontrados em eumetazoários (humanos, insetos, cnidários), como os homólogos mais próximos do gene ancestral. Os homólogos das plantas verdes estão ausentes neste agrupamento, o que pode indicar uma possível perda gênica. Estes homólogos PGRMC, em animais, são proteínas multifuncionais, com uma lista de funções que passa pelo envolvimento na síntese de esteroides e heme, transportes de membrana, regulação metabólica, resposta à progesterona e a conferência de anti-apoptose atribuída à ligação com a progesterona (Ryu, Klein e Zanger, 2017; Hehenberger *et al.*, 2020).

Além disso, as análises evidenciam divergências específicas de homólogos de plantas terrestres (Material Suplementar 4) que neste artigo chamamos Grupo A e Grupo B. Enquanto ambas as árvores de ML e BAY concordam com a presença do Grupo B junto aos homólogos NEUFC, houve divergências quanto à relação do Grupo A e outros homólogos. A relação deste grupo e outros homólogos não ficou bem resolvida na árvore BAY, entretanto, a topologia da árvore de ML sugere relação mais próxima deste grupo com os homólogos NENF.

Evidências levaram à hipótese de que a divergência que originou os ancestrais NENF e NEUFC se deu mais recentemente em relação ao PGRMC (Ryu, Klein e Zanger, 2017; Hehenberger *et al.*, 2020) e nossos resultados corroboram com esta hipótese. A topologia da árvore ML sugere que a origem da duplicação que acarretou a divergência dos parálogos ancestrais NENF e NEUFC parece ser anterior à diversificação exclusiva que vemos nos homólogos vegetais.

As sequências de plantas estudadas foram agrupadas majoritariamente em três agrupamentos maiores, resultados corroborados pela topologia da árvore de BAY. Configurando, assim, um agrupamento de homólogos de plantas similares ao NENF (Grupo A), mais numeroso e que pode ser dividido em dois subgrupos (A1 e A2), e outro de homólogo de plantas similares ao NEUFC (Grupo B), relativamente menor. As funções dos homólogos NENF e NEUFC de opistocontes são relativamente menos conhecidas que PGRMC, mas há evidências de que possam ser secretores de fatores neurotróficos (Ryu, Klein e Zanger, 2017).

Entre os homólogos de plantas mais próximos dos homólogos NENF conhecidos (grupo A), há indícios de que possa ter havido uma divergência, originando os dois subgrupos A1 e A2 (Tab. 1-2). Em humanos, NENF faz parte dos circuitos que controlam apetite, obesidade e ansiedade e já foi relacionado a diversos estudos de câncer.

Chama atenção que seis dos sete parálogos de *T. plicata* (*Acrogymnospermae*) e quatro dos dez parálogos de *O. europeae* (*Asterídea*) encontram-se em A1, enquanto apenas um dos seis parálogos de *O. sativa* (*Monocotiledônea*) se encontram neste agrupamento. Sugerindo que estes homólogos possam ser mais importantes para as estratégias fisiológicas destas duas espécies em relação a outras *O. sativa*, que se reflete na diversidade desses homólogos. Diferenças no número de cópias gênicas são frequentemente refletidas em diferenças no tamanho das famílias gênicas entre espécies, e em muitos casos, a variação do número de parálogos pode ter consequências funcionais relevantes (Ames *et al.*, 2012). É interessante pontuar que, nas duas espécies de *Caryophyllales* estudadas, a maior parte dos parálogos estavam no subgrupo A2. Somente um dos sete parálogos de *T. plicata* se encontra neste subgrupo, junto com quatro dos seis parálogos de *O. sativa* (Tab. 1-2). Chama atenção, também, a ausência de genes de algas no grupo A, indicando a possibilidade destes homólogos configurarem uma diversificação que ocorreu a partir das briófitas.

Os resultados das análises filogenéticas indicam que os genes Ath5 e Ath3, que codificam para proteínas conhecidas como MSBP1 e MSBP2 descritas para *A. thaliana*, encontram-se junto a outros genes no subgrupo A2. Ath5 codifica uma proteína de 220 aminoácidos que se liga com alta afinidade a progesterona e menor afinidade a outros esteroides. Em *A. thaliana*, funciona como um regulador negativo do alongamento celular. Plantas transgênicas que superexpressam este gene, desenvolveram hipocótilos mais curtos e uma maior capacidade de ligação a esteroides em frações de membrana. Quanto às plantas transgênicas que possuíam sub-expressão deste gene, apresentaram hipocótilos longos e redução da capacidade de ligação à esteroides (Yang, Xu e Xue, 2005; Iino *et al.*, 2007).

Há evidências que levam os pesquisadores à hipótese de que estas proteínas de membrana se ligam a esteroides que estimulam o alongamento celular, prevenindo que estes se liguem aos seus sítios de ligação. Além disso, a expressão de MSBP1 no hipocótilo de *A. thaliana* foi suprimida na ausência e ativada na presença de luz (Yang, Xu e Xue, 2005; Janeczko, Kocurek e Marcińska, 2012). Também foi demonstrado que MSBP1 está envolvida na redistribuição de auxina, regulação de tropismo e sinalização de brassinosteróides em *A. thaliana* (Yang, Song e Xue, 2008; Song *et al.*, 2009).

Os homólogos de plantas mais próximos dos homólogos NEUFC conhecidos (Grupo B) são relativamente menos numerosos nas espécies estudadas, em geral, há a presença de um parálogo por espécie, com exceção da *Bryophyta*, *P. patens*, e da angiosperma *Caryophyllales*, *K. laxiflora* cada uma com dois parálogos neste grupo. Além disso, parece estar ausente em *Acrogymnospermas*, o que pode indicar uma possível perda gênica. Os homólogos NEUFC de vertebrados estão implicados com reações do Citocromo P450, esteroidogênese e processos de neurobiologia (Ryu, Klein e Zanger, 2017; Hehenberger *et al.*, 2020).

Houve incertezas com relação às relações dos homólogos de algas *Chlorophyta* e *Charophyta*. Alguns resultados curiosos, porém, chamam atenção, pois foram similares em ambas as análises, como a relação de similaridade próxima entre Vca3 (*V. Carteri*) e os genes de insetos FFLY3 e APIS2. É importante pontuar que estes resultados podem, também ser artefato do problema de atração de braços longos (*long-branch attraction*), na qual dois taxa divergentes com comprimentos de braços longos, que podem estar refletindo acúmulos de mutações/diferenças são inferidas como parentes próximos devido à evolução convergente de um dado caractere (Susko e Roger, 2021)

Ademais, as relações não resolvidas da análise de BAY (politomias) deixam algumas lacunas. Com relação às algas, os resultados apresentados devem ser interpretados com cautela, já que algumas espécies como *Ostreococcus lucimarinus* e *Chara braunii* possuem baixa cobertura genômica e, por conta disso, algumas sequências tiveram que ser excluídas das análises pelo fato de encontrarmos apenas as sequências parciais destes genes (Material Suplementar 1). Além disso, alguns destes genes estão anotados como putativos e sua expressão em tecidos vegetais não foi demonstrada, o que nos leva a não descartar a hipótese de serem pseudogenes.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Parece haver uma forte homologia entre as proteínas desta família gênica, os resultados que tivemos indicam que há divergências exclusivas dentro dos clados de plantas verdes. O baixo suporte de alguns ramos e as politomias resultantes podem indicar uma natureza bem conservada das sequências de aminoácidos desta família gênica, como observado para vertebrados (Kimura *et al.*, 2012). O baixo acúmulo das variações/mutações pode indicar uma forte pressão seletiva para que os domínios sejam mantidos, o que, conseqüentemente, pode estar indicando, também, a manutenção das diferentes funções entre grupos divergentes de genes.

Apesar do crescente interesse nos homólogos de vertebrados desta família gênica, os homólogos de plantas encontram-se ainda pouco explorados. Este trabalho forneceu uma visão inicial mais geral para que possamos traçar algumas hipóteses para novos estudos, necessários para compreender melhor o papel destas proteínas em plantas e sua relação com as funções fisiológicas da progesterona e outros esteroides nestes organismos.

2.6 REFERÊNCIAS

- Ames, R. M. *et al.* (2012) ‘Determining the evolutionary history of gene families’, *Bioinformatics*, 28(1), pp. 48–55. doi: 10.1093/bioinformatics/btr592.
- Cahill, M. A. (2017) ‘The evolutionary appearance of signaling motifs in PGRMC1’, *BioScience Trends*, 11(2), pp. 179–192. doi: 10.5582/bst.2017.01009.
- Castresana, J. (2000) ‘Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis’, *Molecular biology and evolution*, 17(4), pp. 540–552. doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A026334.
- Darriba, D. *et al.* (2011) ‘ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution’, *Bioinformatics* (Oxford, England), 27(8), pp. 1164–1165. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTR088.
- Erdal, S. and Dumlupinar, R. (2011a) ‘Exogenously treated mammalian sex hormones affect inorganic constituents of plants’, *Biological Trace Element Research*, 143(1), pp. 500–506. doi: 10.1007/s12011-010-8857-0.
- Erdal, S. and Dumlupinar, R. (2011b) ‘Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants’, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), pp. 1011–1017. doi: 10.1007/s11738-010-0634-3.
- Ferreira-Guerra, M. *et al.* (2020) ‘Delving into the evolutionary origin of steroid sensing in plants’, *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, pp. 87–95. doi: 10.1016/j.pbi.2020.06.005.
- Filek, M. *et al.* (2017) ‘Regulation of the membrane structure by brassinosteroids and progesterone in winter wheat seedlings exposed to low temperature’, *Steroids*, 128(October), pp. 37–45. doi: 10.1016/j.steroids.2017.10.002.
- Ginzberg, I., Tokuhisa, J. G. and Veilleux, R. E. (2009) ‘Potato steroidal glycoalkaloids: Biosynthesis and genetic manipulation’, *Potato Research*, 52(1), pp. 1–15. doi: 10.1007/s11540-008-9103-4.
- Gruszka, D. (2018) ‘Crosstalk of the brassinosteroid signalosome with phytohormonal and stress signaling components maintains a balance between the processes of growth and stress tolerance’, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9). doi: 10.3390/IJMS19092675.

- Gu, X., Fu, Y. X. and Li, W. H. (1995) 'Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites.', *Molecular Biology and Evolution*, 12(4), pp. 546–557. doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A040235.
- Guo, P. *et al.* (2009) 'Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage', *Journal of Experimental Botany*, 60(12), pp. 3531–3544. doi: 10.1093/jxb/erp194.
- Hartmann, S., Lacorn, M. and Steinhart, H. (1998) 'Natural occurrence of steroid hormones in food', *Food Chemistry*, 62(1), pp. 7–20. doi: 10.1016/S0308-8146(97)00150-7.
- Hehenberger, E. *et al.* (2020) 'Early eukaryotic origins and metazoan elaboration of MAPR family proteins', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 148, p. 106814. doi: 10.1016/j.ympev.2020.106814.
- Iino, M. *et al.* (2007) 'Progesterone: Its occurrence in plants and involvement in plant growth', *Phytochemistry*, 68(12), pp. 1664–1673. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.002.
- Janeczko, A. (2012) 'The presence and activity of progesterone in the plant kingdom', *Steroids*, 77(3), pp. 169–173. doi: 10.1016/j.steroids.2011.10.012.
- Janeczko, A. *et al.* (2013) 'Endogenous progesterone and its cellular binding sites in wheat exposed to drought stress', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 138, pp. 384–394. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.07.014.
- Janeczko, A. and Filek, W. (2002) 'Stimulation of generative development in partly vernalized winter wheat by animal sex hormones', *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(3), pp. 291–295. doi: 10.1007/s11738-002-0054-0.
- Janeczko, A., Kocurek, M. and Marcińska, I. (2012) 'Mammalian androgen stimulates photosynthesis in drought-stressed soybean', *Central European Journal of Biology*, 7(5), pp. 902–909. doi: 10.2478/s11535-012-0068-6.
- Janeczko, A. and Skoczowski, A. (2005) 'Mammalian sex hormones in plants', *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 43(2), pp. 71–79. doi: 10.5603/4616.
- Kao, A. L. *et al.* (2005) 'Characterization of a novel Arabidopsis protein family AtMAPR homologous to 25-Dx/IZAg/Hpr6.6 proteins', *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46(2), pp. 107–118. doi: 10.7016/BBAS.200504.0107.
- Kreis and Müller-Uri (2010) *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. 2nd edn. Edited by M. Wink. Blackwell Publishing Ltd.
- Kumar, S., Glen, S. and Koichiro, T. (2016) 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets', *Molecular biology and evolution*, 33(7), pp. 1870–1874. doi: 10.1093/MOLBEV/MSW054.
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., & Hedges, S. B. (2017). TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times. *Molecular Biology and Evolution*, 34(7), 1812–1819. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSX116>

- Le, S. and Gascuel, O. (2008) 'An improved general amino acid replacement matrix', *Molecular biology and evolution*, 25(7), pp. 1307–1320. doi: 10.1093/MOLBEV/MSN067.
- Lindemann, P. (2015) 'Steroidogenesis in plants - Biosynthesis and conversions of progesterone and other pregnane derivatives', *Steroids*, 103(August), pp. 145–152. doi: 10.1016/j.steroids.2015.08.007.
- Mifsud, W. and Bateman, A. (2002) 'Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain', *Genome biology*, 3(12), p. research0068.1. doi: 10.1186/gb-2002-3-12-research0068.
- Milanesi, L. and Boland, R. (2004) 'Presence of estrogen receptor (ER)-like proteins and endogenous ligands for ER in solanaceae', *Plant Science*, 166(2), pp. 397–404. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.10.006.
- Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T. and von Haeseler, A. (2013) 'Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap', *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), pp. 1188–1195. doi: 10.1093/MOLBEV/MST024.
- Norman, A. W., Mizwicki, M. T. and Norman, D. P. G. (2004) 'STEROID-HORMONE RAPID ACTIONS , MEMBRANE RECEPTORS AND A CON- FORMATIONAL ENSEMBLE MODEL'. doi: 10.1038/nrd1283.
- Ohta, H., & Itoh, N. (2012). *The membrane-associated progesterone receptor (MAPR) protein family. 14.*
- Ohyama, K. *et al.* (2009) 'Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), pp. 725–730. doi: 10.1073/pnas.0807675106.
- Rambaut, A. and Drummond, A.J. (2012) FigTree version 1.4. 0.
- Rambaut, A. *et al.* (2018) 'Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7', *Systematic biology*, 67(5), pp. 901–904. doi: 10.1093/SYSBIO/SYY032.
- Ren, J. *et al.* (2019) 'Genomic sequence analyses of classical and non-classical lamprey progesterone receptor genes and the inference of homologous gene evolution in metazoans', *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/s12862-019-1463-7.
- Ronquist, F. *et al.* (2012) 'MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space', *Systematic Biology*, 61(3), p. 539. doi: 10.1093/SYSBIO/SYS029.
- Ryu, C. S., Klein, K. and Zanger, U. M. (2017) 'Membrane associated progesterone receptors: Promiscuous proteins with pleiotropic functions - Focus on interactions with cytochromes P450', *Frontiers in Pharmacology*, 8(MAR). doi: 10.3389/FPHAR.2017.00159.
- Shi, Q. M. *et al.* (2011) 'Arabidopsis MSBP1 is activated by HY5 and HYH and is involved in photomorphogenesis and brassinosteroid sensitivity regulation', *Molecular Plant*, 4(6), pp. 1092–1104. doi: 10.1093/mp/ssr049.

- Smith, H. A., Mark Welch, D. B. and Snell, T. W. (2011) 'Molecular evolution of the membrane associated progesterone receptor in the *Brachionus plicatilis* (Rotifera, Monogononta) species complex', *Hydrobiologia*, 662(1), pp. 99–106. doi: 10.1007/s10750-010-0484-4.
- Song, L. *et al.* (2009) 'Membrane steroid-binding protein 1 (MSBP1) negatively regulates brassinosteroid signaling by enhancing the endocytosis of BAK1', *Cell Research* 2009 19:7, 19(7), pp. 864–876. doi: 10.1038/cr.2009.66.
- Susko, E. and Roger, A. J. (2021) 'Long Branch Attraction Biases in Phylogenetics', *Systematic biology*, 70(4), pp. 838–843. doi: 10.1093/sysbio/syab001.
- Tarkowská, D. (2019) 'Plants are capable of synthesizing animal steroid hormones', *Molecules*, 24(14), pp. 1–13. doi: 10.3390/molecules24142585.
- Turk, H. (2021). Progesterone Promotes Mitochondrial Respiration at the Biochemical and Molecular Level in Germinating Maize Seeds. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/PLANTS10071326>
- Weikum, E. R., Liu, X. and Ortlund, E. A. (2018) 'The nuclear receptor superfamily: A structural perspective', *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 27(11), p. 1876. doi: 10.1002/PRO.3496.
- Yang, X. H., Xu, Z. H. and Xue, H. W. (2005) 'Arabidopsis Membrane Steroid Binding Protein 1 is involved in inhibition of cell elongation', *The Plant Cell*, 17(1), pp. 116–131. doi: 10.1105/tpc.104.028381.
- Yang, X., Song, L. and Xue, H. W. (2008) 'Membrane steroid binding protein 1 (MSBP1) stimulates tropism by regulating vesicle trafficking and auxin redistribution', *Molecular Plant*, 1(6), pp. 1077–1087. doi: 10.1093/mp/ssn071.
- Zenda, T. *et al.* (2018) 'Comparative Proteomic and Physiological Analyses of Two Divergent Maize Inbred Lines Provide More Insights into Drought-Stress Tolerance Mechanisms', *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 3225, 19(10), p. 3225. doi: 10.3390/IJMS19103225.
- Zhang, J. *et al.* (2017) 'De novo sequencing and transcriptome analysis reveal key genes regulating steroid metabolism in leaves, roots, adventitious roots and calli of *periploca sepium bunge*', *Frontiers in Plant Science*, 8(April), pp. 1–15. doi: 10.3389/fpls.2017.00594.

Material Suplementar 1: Sequências de homólogos de organismos *Viridiplantae* utilizadas nas análises resgatadas das bases de dados *Phytozome* e *EnsemblPlants*:

Espécie	Código	Gene (Phytozome, Ensembl Plants)
<i>Porphyra umbilicalis</i> (Rhodophyta)	Pum1PGRMC1AlgaRhodo	Pum2051s0001.1.p
	Pum2AlgaRhodo	Pum0461s0014.1.p
<i>Galdieria sulphuraria</i> (Rhodophyta, extremófila)	Gsu1AlgaRhodoX	EME31869
	Gsu2AlgaRhodoX	EME29146
<i>Ostreococcus lucimarinus</i> (Chlorophyta basal)	Olu1AlgaChloro	ABO96123
	Olu2*	ABO94361
	Olu3*	ABO94361
<i>Volvox carteri</i> (Chlorophyta)	Vca1AlgaChloro	Vocar.0001s0177.1.p
	Vca2AlgaChloro	Vocar.0001s0675.1.p
	Vca3NEUFCAAlgaChloro	Vocar.0019s0033.1.p
<i>Chara braunii</i> (Charales)	Cbr1AlgaCharophyta	GBG75004
	Cbr2AlgaCharophyta	GBG62476
	Cbr3*	GBG61145
	Cbr4*	GBG75004
<i>Marchantia polymorpha</i> (Marchantiophyta)	Mpo1PGRMC1Marchan	Mapoly0146s0039.1 (PGRMC1_2)
	Mpo2MSBP1relatedMarchan	Mapoly0033s0005.1 (MSBP1-related)
	Mpo3NEUFCMarchan	Mapoly0115s0059.1 (neuferricin)
<i>Physcomitrium patens</i> (Bryophyta)	Ppa1Bryo	Pp3c1_15400V3.1
	Ppa2MSBP1relatedBryo	Pp3c7_25400V3.1
	Ppa3MSBP1relatedBryo	Pp3c1_6930V3.1
	Ppa4MSBP1relatedBryo	Pp3c2_30040V3.1
	Ppa5Bryo	Pp3c21_2980V3.1
	Ppa6NEUFEBryo	Pp3c18_20590V3.1
<i>Sphagnum magellanicum</i> (Bryophyta)	Sma1PGRMC1Bryo	Sphmag03G044500.1.p -2
	Sma2PGRMC1Bryo	Sphmag16G046200.1.p -2
	Sma3PGRMC1Bryo	Sphmag17G075600.1.p -2,3
	Sma4PGRMC1Bryo	Sphmag12G040100.1.p
	Sma5PGRMC1Bryo	Sphmag19G064400.1.p
	Sma6NEUFEBryo	Sphmag06G108300.1.p
<i>Selaginella moellendorffi</i> (Lycophyta)	Smo1MSBP1relatedLyco	19427(PAC:15403467), MSBP1
	Smo2Lyco	272366(PAC:15403020)
	Smo3Lyco	228191(PAC:15405464)
	Smo4Lyco	58069(PAC:15404061),msbp2
	Smo5NEUFCLyco	75872(PAC:15415959)msbp4
<i>Ceratopteris richardii</i> (Monilophyta, aquática)	Cri1PGRMC1FernMoni	Ceric.25G021300.1.p
	Cri2MSBP1FernMoni	Ceric.18G079200.1.p
	Cri3NEUFCEFernMoni	Ceric.02G053600.1.p

<i>Thuja plicata</i> (Acrogymnospermae)	Tpl1PGRMC1AcroGym	Thupl.29379080s0005.1.p
	Tpl2AcroGym	Thupl.29071727s0001.1.p
	Tpl3AcroGym	Thupl.29382101s0001.1.p
	Tpl4AcroGym	Thupl.29379080s0007.1.p
	Tpl5AcroGym	Thupl.28850574s0001.1.p
	Tpl6AcroGym	Thupl.29379882s0003.1.p
	Tpl7MSBP1relatedAcroGym	Thupl.29380711s0003.1.p
<i>Nymphaea colorata</i> (Magnoliophyta, basal)	Nco1AngioBasal	NC3G0228590.1:cds
	Nco2AngioBasal	NC1G0129340.1:cds
	Nco3AngioBasal	NC12G0095020.1:cds
	Nco4AngioBasal	NC1G0181340.1:cds
<i>Amborella trichopoda</i> (Magnoliophyta, basal)	Atr1AngioBasal	evm_27.TU.AmTr_v1.0_scaffold00019.45 (PAC:31572080)
	Atr2AngioBasal	evm_27.TU.AmTr_v1.0_scaffold00101.58 (PAC:31558316)
	Atr3MSBP1relatedAngioBasal	evm_27.TU.AmTr_v1.0_scaffold00009.339 (PAC:31568685)
	Atr4NEUFCErelatedAngioBasal	evm_27.TU.AmTr_v1.0_scaffold00068.184 (PAC:31573406)
<i>Oryza sativa</i> (Monocotiledônea)	Osa1Monocot	LOC_Os02g55060.1
	Osa2Monocot	LOC_Os03g20470.1
	Osa3Monocot	LOC_Os10g35850.1
	Osa4Monocot	LOC_Os10g35870.1
	Osa5Monocot	LOC_Os02g42740.1
	Osa6Monocot	LOC_Os03g10790.1
<i>Aquilegia coerulea</i> (Eudicotiledônea basal, <i>Ranunculales</i>)	Aco1EuBasal	Aqcoe7G347700.1.p
	Aco2MSBP1relatedEuBasal	Aqcoe7G039800.1.p
	Aco3EuBasal	Aqcoe1G155400.1.p
<i>Kalanchoe laxiflora</i> (Eudicotiledônea, <i>Pentapetelae</i> , <i>Caryophyllales</i>)	Kla1EuCaryo	Kalax.0292s0024.1.p
	Kla2EuCaryo	Kalax.0014s0136.1.p
	Kla3MSBP1relatedEuCaryo	Kalax.0519s0021.1.p
	Kla4EuCaryo	Kalax.1877s0002.1.p
	Kla5EuCaryo	Kalax.0195s0056.1.p
	Kla6EuCaryo	Kalax.0178s0018.1.p
	Kla7NEUFCEuCaryo	Kalax.0366s0032.1.p
	Kla8NEUFCEuCaryo	Kalax.0008s0031.1.p
<i>Amaranthus hypochondriacus</i> (Eudicotiledônea, <i>Pentapentale</i> , <i>Caryophyllales</i>)	Ahy1EuCaryo	AH018995-RA
	Ahy2EuCaryo	AH016635-RA
	Ahy3MSPB1relatedEuCaryo	AH012375-RA
	Ahy4EuCaryo	AH019485-RA
<i>Solanum lycopersicum ITAG4.0</i> (Eudicotiledônea, Asteridea I)	Sly1PGRMC1EuAsterid1	Solyc08g029160.1.1
	Sly2EuAsterid1	Solyc04g049790.3.1
	Sly3MSBP1relatedEuAsterid1	Solyc03g025950.4.1

	Sly4MSBP1relatedEuAsterid1	Solyc06g035870.3.1
	Sly5NEUFCEuAsterid1	Solyc07g044830.3.1
<i>Olea europaea</i> (Eudicotiledônea, Asteridea II)	Oeu1PGRMC1EuAsterid2	Oeu060654.1
	Oeu2PGRMC1EuAsterid2	Oeu048544.1
	Oeu3PGRMC1EuAsterid2	Oeu048543.1
	Oeu4PGRMC1EuAsterid2	Oeu006859.1
	Oeu5MSBP1relatedEuAsterid2	Oeu021780.1
	Oeu6PGRMC1EuAsterid2	Oeu056242.1
	Oeu7MSBP1relatedEuAsterid2	Oeu062758.1
	Oeu8EuAsterid2	Oeu060741.1
	Oeu9PGRMC1EuAsterid2	Oeu024232.1
	Oeu10NEUFCEuAsterid2	Oeu011642.1
<i>Vitis vinifera</i> (Eudicotiledônea Rosidea)	Vvi1PGRMC1EuRosidB	VIT_204s0008g06870.1
	Vvi2MSBP1relatedEuRosidB	VIT_216s0100g01280.1
	Vvi3NEUFCEuRosidB	VIT_202s0012g02780.1
<i>Cucumis sativus</i> (Eudicotiledônea, Rosidea I)	Csa1EuRosid1	Cucsa.162900.1
	Csa2EuRosid1	Cucsa.162910.1
	Csa3EuRosid1	Cucsa.337260.1
	Csa4MSBP1EuRosid1	Cucsa.313970.1
	Csa5NEUFCEuRosid1	Cucsa.058560.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Eudicotiledônea, Rosidea II)	Ath2EuRosid2	AT2G24940.1
	Ath5MSBP1EuRosid2	AT5G52240.1
	Ath3MSBP2EuRosid2	AT3G48890.1
	Ath4EuRosid2	AT4G14965.1

* Sequências excluídas da análise por apresentarem anotação parcial nas bases de dados *Phytozome*, *Ensembl* e NCBI.

Material Suplementar 2: Sequências de homólogos de organismos Opisthokonta utilizadas nas análises resgatadas das bases de dados EnsemblFungi e EnsemblMetazoa.

Espécie	Código	Gene (Ensembl)
<i>Paramicrosporidium saccamoebae</i> (Fungi, basal)	FUNGIPsa1Basal	PJF17444
<i>Rhizoclosmatium globosum</i> (Fungi, Chytridiomycota)	FUNGIRgl1	ORY43412
	FUNGIRgl2	ORY48454
	FUNGIRgl3*	ORY49194
	FUNGIRgl4	ORY48455
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fungi, Ascomycote)	YEASToDAP1	YPL170W
<i>Aspergillus nidulans</i> (Fungi, Ascomycote)	FUNGIAni1oDAP1put	CBF76435
	FUNGIAni2	CBF88452
	FUNGIAni3	CBF77749
<i>Amanita muscaria</i> (Fungi, Basidiomycote)	FUNGIAmu1Basidio	KIL58663
	FUNGIAmu2Basidio	KIL57771
<i>Puccinia graminis</i> (Fungi, Basidiomycote)	FUNGIPgr1Basidio	EFP76928
	FUNGIPgr2Basidio	EFP92980
	FUNGIPgr3Basidio	EFP93886
<i>Amphimedon queenslandica</i> (Metazoa, basal)	METAZOABasalAqu1	Aqu2.1.29877_001
<i>Trichoplax adhaerens</i> (Eumetazoa, basal)	EUMETAPLACOOA1*	TriadP16260
	EUMETAPLACOOA2	TriadP56832
<i>Actinia equina</i> (Eumetazoa não-bilateral, Cnidaria)	EUMETACNIDAeq1	EGACTEQ4350028220-PA
	EUMETACNIDAeq2	EGACTEQ4350035472-PA
	EUMETACNIDAeq3	EGACTEQ4350015310-PA
	EUMETACNIDAeq4	EGACTEQ4350009844-PB
<i>Nematostella vectensis</i> (Eumetazoa não-bilateral, Cnidaria)	EUMETACNIDANve1NENF	XP_001628837.2
	EUMETACNIDANve2PGRMC2	XP_001639070.2
	EUMETACNIDANve3PGRMC1	XP_032222929.1
	EUMETACNIDANve4NEUFC	XP_001636685.2
<i>Mnemiopsis leidyi</i> (Eumetazoa não-bilateral, Ctenophora)	EUMETACNTENML1	ML09173a-PA
	EUMETACNTENML2	ML074811a-PA
<i>Ciona intestinalis</i> (Eumetazoa, Urochordata basal)	BILATUROCHORCin1	ENSCINT00000037319.1
	BILATUROCHORCin2	ENSCINT00000006292.3
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Eumetazoa Protostomia, Nematoda)	BILATpNEMACel1oNEUFlike	H38K22.3.1
	BILATpNEMACel2	K07E3.8.1
<i>Trichinella spiralis</i> (Eumetazoa Protostomia, Nematoda)	BILATpNEMATsp1	EFV58396
	BILATpNEMATsp2	EFV58821
<i>Drosophila melanogaster</i> (Eumetazoa Protostomia, Arthropoda)	BILATpFFLY1oMSBP	FBpp0290813
	BILATpFFLY2	FBpp0080101
	BILATpFFLY3	FBpp0071240

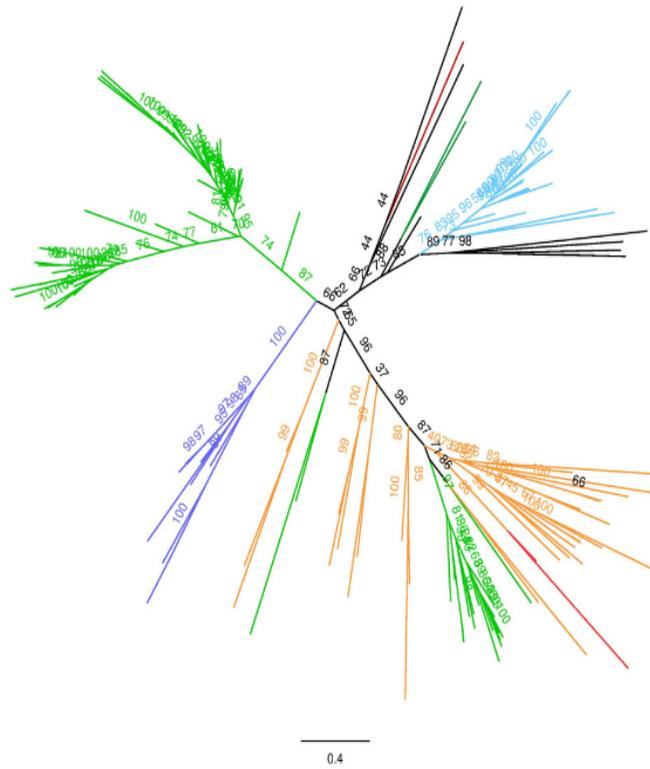
	BILATpFFLY4oCcup	FBpp0077562
Apis mellifera (Eumetazoa Protostomia, Arthropoda)	BILATpAPIS1PGRMC1	XP_396615
	BILATpAPIS2NEUFC	XP_006566840
Capitella teleta (Eumetazoa Protostomia, Annelida)	BILATpANNELCte1	CapteP227540
	BILATpANNELCte2	CapteP110664
	BILATpANNELCte3	CapteP223862
	BILATpANNELCte4	CapteP201522
	BILATpANNELCte5	CapteP117808
Helobdella robusta (Eumetazoa Protostomia, Annelida)	BILATpANNELHro1	HelroP173681
	BILATpANNELHro2	HelroP74560
	BILATpANNELHro3	HelroP65888
Lottia gigantea (Eumetazoa Protostomia, Mollusca)	BILATpMOLLULgi1*	LotgiP77624
	BILATpMOLLULgi2	LotgiP178036
	BILATpMOLLULgi3	LotgiP116983
Crassostrea gigas (Eumetazoa Protostomia, Mollusca)	BILATpMOLLUCgi1MAPR2	EKC28875
	BILATpMOLLUCgi2CYB5D2	EKC42144
Branchiostoma lanceolatum (Eumetazoa, Deuterostomia basal)	BILATdCEFALOC1	BL10523_cuf0
	BILATdCEFALOC2	BL23914_cuf1
	BILATdCEFALOC3	BL23514_evm0
	BILATdCEFALOC4	BL00426_cuf0
Strongylocentrotus purpuratus (Eumetazoa, Deuterostomia basal)	BILATdECHINO1NEUFlake	XP_030847183
	BILATdECHINO2NEUF	XP_797342
	BILATdECHINO3NENF	XP_003727182
	BILATdECHINO4PGRC1like	XP_783332
	BILATdECHINO5PGRC1	XP_030836360
Anas platyrhynchos (Eumetazoa, Chordata)	BILATdDUCK1oNENF	ENSAPLT00000033307.1
	BILATdDUCK2oPGRMC1	ENSAPLT00000012925.2
	BILATdDUCK3oPGRMC2	ENSAPLT00000035902.1
Homo sapiens (Eumetazoa, Chordata)	BILATdHUMAN1oNENF	ENSP00000355955
	BILATdHUMAN2oPGRMC1	ENSP00000217971
	BILATdHUMAN3oPGRMC2	ENSP00000429301
	BILATdHUMAN4oCYB5D2	ENSP00000301391
Rattus norvegicus (Eumetazoa, Chordata)	BILATdRAT1oNENF	ENSRNOP00000005190
	BILATdRAT2oPGRMC1	ENSRNOP00000071066
	BILATdRAT3oPGRMC2	ENSRNOP00000018796
	BILATdRAT4oCYB5D2	ENSRNOP00000038452
Sus scrofa (Eumetazoa, Chordata)	BILATdPIG1oNENF	ENSSSCP00000051788
	BILATdPIG2oPGRMC1	ENSSSCP00000013423
	BILATdPIG3oCYB5D2	ENSSSCP00000050282

* Sequências excluídas da análise por apresentarem anotação parcial nas bases de dados *Ensembl* e *NCBI*.

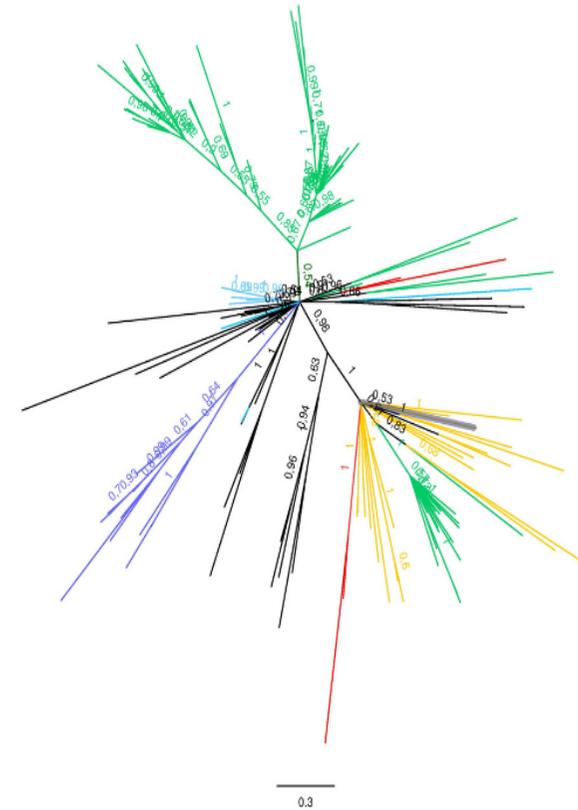
Material Suplementar 4: Árvores Radiais

a. Estimção de Máxima Verossimilhança (Figura 3) e b. Inferência Bayesiana (Material Suplementar 3). Legenda: Azul claro: homólogos PGRMC; Azul escuro: homólogos NENF; Laranja: homólogos NEUFC; Verde: homólogos de plantas verdes.

a.



b.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações que foram apresentadas nesta pesquisa com relação à presença, metabolismo e ação destes esteroides na fisiologia das plantas constituem parte de um esforço de diversos pesquisadores e grupos de pesquisa. Neste sentido, a partir das estratégias de busca empregadas, foi possível reunir pistas sobre a importância destes esteroides no desenvolvimento primário e reprodutivo de plantas, além da sua influência no metabolismo de tolerância às condições de estresse abiótico destes organismos. Dentro dos limites de abrangência taxonômica dos dados de detecção e identificação coletados, progesterona, estrógenos e andrógenos parecem estar presentes em grande parte das angiospermas (Magnoliophyta) e há indícios de que possa estar presentes em outros grupos de plantas terrestres como Monilophyta e Pinophyta. Se considerarmos as proteínas de ligação MAPR de plantas como indicadores da presença e sinalização endógena de esteroides, além de endossar esta presença nos clados já citados, os resultados no contexto desta pesquisa apresentam indícios de que estão presentes nas plantas terrestres a partir de Marchantiophyta e Bryophyta.

O baixo suporte de alguns ramos e as politomias resultantes das reconstruções filogenéticas podem ser reflexo da natureza bem conservada das sequências de aminoácidos desta família gênica, mas também, uma insuficiência na amostragem, sendo assim, necessário realizar estudos futuros com amostragens mais robustas. Este baixo acúmulo de variações/mutações pode indicar uma pressão seletiva para a manutenção dos domínios de ligação e aderência a membranas destas proteínas e, possivelmente, das funções dependentes destes domínios conservados. Os três agrupamentos encontrados nas MAPR de Viridiplantae (A1, A2 e B) e a distribuição de cópias diferente entre clados levantam algumas questões quanto à natureza das funções (celulares, fisiológicas, metabólicas) destas proteínas. Como perspectivas futuras para qualificar e aprofundar estes resultados, um dos muitos desdobramentos que se apresentam, é, a partir de uma amostragem mais representativa de sequências de genes MAPR de Viridiplantae, e realizar uma análise de mapeamento de perda e ganho de genes, já que estes eventos frequentemente refletem o tamanho das famílias gênicas entre espécies e esta variação do número de parálogos pode ter consequências funcionais relevantes.