

A INFLUÊNCIA TÉRMICA NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E SUA AÇÃO NA DINÂMICA DAS MEMBRANAS CELULARES

Cristiéle da Silva Ribeiro

*Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, USP
Recebido 19out09 / Aceito 14jan10 / Publicação inicial 15abr10
cristiele@usp.br*

Resumo. A influência humana nos sistemas naturais tem aumentado continuamente, justificando a importância de se investigar os aspectos antrópicos que causam estresse em animais em seus sistemas naturais. No ambiente aquático, as ações antrópicas são muito evidentes, levando os organismos muitas vezes a ficarem expostos a efeitos subletais que provocam consequências imprevisíveis. Variações na temperatura alteram a estrutura das membranas celulares podendo comprometer as atividades enzimáticas associadas às membranas e os processos de transporte. Nesse sentido este texto busca levantar hipóteses sobre o possível papel da temperatura em mudanças estruturais das membranas celulares.

Palavras-chave. Dessaturases, Elongases, Ácidos graxos, Regulação da expressão gênica.

THERMAL INFLUENCE ON GENE EXPRESSION REGULATION AND ITS ACTION IN THE DYNAMICS OF CELL MEMBRANES

Abstract. The human influence on natural systems has been steadily increased, justifying the importance to investigate the antropic factors that cause stress in animals in their natural systems. In the aquatic environment the human actions are very evident, leading the organisms sometimes to be exposed to sub lethal effects that can cause unpredictable consequences. Variations in temperature affect the structure of cell membranes and can compromise the enzymatic activity associated with the membranes and the transport processes. In this sense, this assay postulates some hypothesis about the possible role of temperature on structural changes of cell membranes.

Keywords. Desaturases, Fatty acids, Gene expression.

Ação da temperatura nas membranas biológicas e seu papel na regulação da expressão gênica

A faixa ótima de temperatura varia entre as espécies e as oscilações térmicas podem causar alterações nas propriedades estruturais e fisiológicas dos organismos (Hochachka e Somero, 2002).

Variações na temperatura alteram a estrutura das membranas celulares podendo comprometer as atividades enzimáticas associadas às membranas e os processos de transporte. O conjunto de alterações das propriedades químicas e físicas das membranas resulta, em última análise, em mudanças na fluidez das mesmas (Hazel, 1984). A queda de temperatura pode comprometer sua flexibilidade, devido a alterações na configuração dos seus lipídeos e proteínas, podendo limitar a sua estabilização. O grau de fluidez de membranas biológicas pode ser estimado por muitos métodos físicos, tais como: fluorescência, ressonância e espectroscopia. A extensão de insaturações dos ácidos graxos contidos na estrutura da membrana é o fator majoritário na manutenção do grau de fluidez (Kates e col., 1993).

Organismos vivos, em particular ectotérmicos respondem à diminuição da temperatura por dessaturação de ácidos graxos nos lipídeos de suas membranas. Essa resposta de aclimação confere habilidade de manutenção da fluidez de membranas biológicas abaixo da temperatura crítica para o indivíduo. Esse fenômeno é conhecido como aclimação

homoviscosa ou, alternativamente, aclimação homeofásica (Buda e col., 1994; Lemieux e col., 2008). Os efeitos da temperatura no padrão de distribuição dos ácidos graxos e ação de enzimas que participam da manutenção da fluidez da membrana em diferentes organismos têm sido reportados por vários autores, sendo que a primeira observação foi feita em 1901 (Torrengo e Brenner, 1976).

Quando se analisa a exposição aguda de animais às baixas temperaturas é possível observar na maioria das vezes um aumento na porcentagem de ácidos graxos insaturados nas membranas celulares e redução na porcentagem de ácidos graxos saturados. Uma revisão da literatura mostra que, de forma geral, animais que vivem em temperaturas mais baixas apresentam uma maior porcentagem de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) do que aqueles de clima tropical (Hazel e Willians, 1990). Essas variações alteram o ponto de fusão dos ácidos graxos esterificados nos fosfolipídios das membranas biológicas, alterando assim a fluidez das mesmas (Hazel, 1989).

A habilidade das células de modular características físicas de suas membranas é desempenhada pelas enzimas ácido graxo dessaturases, que operam em resposta a baixas temperaturas de forma a assegurar as propriedades físicas que atuam na manutenção do gradiente de íons e restauração de funções de enzimas associadas às membranas (Murata e Wada, 1995). Pensando nisso Murata e Los, (1997), em revisão sobre estrutura e expressão

de ácido graxo dessaturases, postularam 2 questões importantes que deveriam ser respondidas a respeito dos mecanismos moleculares da regulação da expressão de genes de dessaturases em resposta à mudança de temperatura:

1- Como um organismo "sente" a mudança de temperatura?

2- Como esse sinal é transmitido para regiões reguladoras de genes de enzimas dessaturases para induzir sua ativação em condições de baixas temperaturas?

Tentando responder essas questões, aqueles autores formularam o seguinte modelo: abaixo de determinadas temperaturas a fluidez das membranas decresce. Esse sinal é detectado por um sensor de baixa temperatura e transmitido para mecanismos reguladores que direta ou indiretamente interagem com regiões reguladoras de genes que codificam enzimas dessaturases, ativando-os e levando a uma maior expressão das enzimas. Como resultado, o nível de enzimas aumenta e os ácidos graxos passam por processos de insaturação. Finalmente, o acúmulo de ácidos graxos insaturados leva à recuperação da fluidez de membrana e à restauração da atividade de enzimas membrana-associadas. Nesse modelo, as membranas assumem um papel chave na percepção e transdução de sinais de temperatura para regiões regulatórias de genes dessas enzimas. Porém, naquele momento (1997), não se sabia como esses sinais eram reconhecidos pela maquinaria de expressão e tradução das enzimas.

Após muitos anos de pesquisa alguns pontos dessa sinalização começaram a ser elucidados e em 2000 os mesmos autores, Los e Murata, descreveram alguns sinalizadores principais, a saber :

- Proteínas quinase C em fungos;
- Mudanças na concentração de adenosina 3'5' monofosfato em humanos;
- Aumento da concentração de Ca^{2+} em peixes e anfíbios;
- E, atividade aumentada dos receptores de fosfolipase C em ratos (Los e Murata, 2000).

Estrutura, função e regulação da expressão gênica das enzimas dessaturases

Dessaturases de ácidos graxos são enzimas que convertem uma ligação simples (C-C) a uma dupla (C=C) entre dois átomos de carbono na cadeia de ácidos graxos, como por exemplo nas posições $\Delta 6$, $\Delta 9$ ou $\Delta 12$ (Cossins e col., 2002), alterando, em casos extremos a temperatura de transição das membranas plasmáticas de gel (sólido) para líquido cristalino, promovendo a fluidez (Russel, 1984) e comprovadamente estão presentes em todos os grupos de organismos (Los e Murata, 1998).

A reação desencadeada por essas enzimas requer oxigênio molecular e ocorre em condições aeróbicas (Los e Murata, 1998), sendo

uma reação de oxidação, que requer 2 elétrons em adição a uma molécula de oxigênio. Ferredoxina é o doador de elétrons na reação catalisada pela acil-ACP dessaturase em cianobactérias e por acil-lipídeos em plastídeos de plantas, em contraste, as acil-CoA de animais e fungos se utilizam de citocromo *b5* como doadores de elétrons (Los e Murata, 1998). As acil-coA de animais são expressas de forma mais efetiva no retículo endoplasmático do fígado dos animais e podem responder a centenas de estímulos endógenos e exógenos (Trueman e col., 2000).

A temperatura é considerada o principal elemento regulador do aumento de expressão de enzimas dessaturases, porém, essa regulação é dependente da extensão da mudança termal em contraste com a simples queda ou elevação da temperatura, por exemplo, quando células aclimatadas a 38°C são levadas a 30°C existe um aumento de transcritos da *desA* (dessaturase A), enquanto que em células aclimatadas a 36°C esse aumento começa a ser detectado somente a 26°C (Los e col., 1993). O trabalho de Podrabsky e Somero, (2004) ressaltou também a importância das flutuações diárias da temperatura na regulação da expressão gênica da enzima dessaturase, encontrando maior quantidade de RNA mensageiro da enzima em animais que passavam o dia na temperatura ambiental, sem controle (20 a 37°C aproximadamente) quando comparado a animais aclimatados a temperaturas constantes (20-30-37°C).

Todas essas observações feitas pelos autores abriram um grande leque de conhecimento sobre a expressão gênica nos diferentes modelos experimentais nas diferentes condições metodológicas empregadas, e começou-se a desenhar, como ocorreram para todos os fenômenos de regulação da expressão gênica descobertos, modelos de como o controle da temperatura age sobre regiões regulatórias e genes codificadores chegando-se à hipótese de que, durante a aclimação, e mais extremo, na adaptação frente a mudanças ambientais, 2 tipos de respostas de regulação são esperados:

- **Regulação qualitativa** - mudança no tipo de proteína expressa, como no caso de produção de isoformas que desempenhariam a mesma função, com algumas propriedades bioquímicas distintas;

- **Regulação quantitativa** - aumento da quantidade de transcritos de RNA mensageiro e consequentemente de proteínas produzidas (Schulte, 2004).

Para exemplificar esses dois tipos de regulação foi escolhida a enzima dessaturase mais estudada em relação à aclimação a baixas temperaturas, a esteroil-CoA $\Delta 9$ dessaturase, que age acrescentando uma insaturação entre os carbonos 9 e 10 da cadeia de ácidos graxos, modificando assim, propriedades físicas da membrana e como resultado final aumentando a

fluidez da mesma, sendo que essa enzima age em conjunto com acil-transferases específicas que posicionam esses ácidos graxos modificados nos fosfolipídeos (Trueman e col.,2000, Pereira e col., 2003 e Polley e col.,2003).

Polley e col., (2003) demonstraram que carpas apresentam a expressão de 2 isoformas de estearoil-CoA $\Delta 9$ dessaturase (SCD), sendo que cada uma dessas isoformas responde a um tipo de estímulo específico, a SCD1 aparece como sendo responsiva a dietas enriquecidas com ácidos graxos saturados enquanto que a SCD2 apresenta aumento da expressão gênica em resposta a mudanças na temperatura ambiental. A diferença entre essas duas isoformas está relacionada a um processo de *splicing* alternativo em que a segunda isoforma perdeu cerca de 21 aminoácidos de sua cadeia.

Esse fenômeno de duplicação possivelmente ocorreu no genoma de teleostes primitivos e foi evolutivamente conservado em alguns grupos, como é o caso dos Ciprinídeos e de algumas espécies de peixes antárticos, possivelmente tendo divergido em suas regiões regulatórias, cada qual respondendo a diferentes estímulos fisiológicos, porém não divergindo em suas sequências codificadoras (Evans e col.,2008). Esse mecanismo promoveria a esses grupos, num contexto ambiental adverso a adição de enzimas complementares que confeririam maior plasticidade fisiológica, e como consequência capacidade de tolerância a amplas condições ambientais (Polley e col.,2003).

Exemplificando-se agora a regulação quantitativa, novamente verificou-se que dois tipos de regulação da expressão gênica são esperados, o primeiro em que RNAs mensageiros latentes são ativados em processos pós-transcricionais quando o animal é defrontado com condições ambientais adversas, e num segundo momento, por sinalização da primeira resposta, novos transcritos são produzidos e existe um aumento da expressão gênica das enzimas dessaturases, esse fenômeno foi verificado em muitos trabalhos, como por exemplo, Trueman e col., (2000) testando a aclimação a frio de carpas encontrou alta expressão de RNA mensageiro (2 a 4 vezes maior que no grupo controle) somente no 2º dia de tratamento, enquanto que ação enzimática aumentada ocorreu em apenas algumas horas de aclimação.

Outro trabalho relatando a regulação da expressão gênica quantitativa mostrou também a capacidade de diferentes espécies de suportar grandes mudanças de temperatura ambiental. Hsieh e Kuo, (2005) testaram a aclimação a frio (25 \rightarrow 15°C) em “milkfish” e carpa-comum, encontrando altas concentrações de RNA mensageiro de SCD no primeiro grupo nos primeiros 4 dias de experimento, enquanto que as carpas mantinham quantidades sempre constantes de transcritos ao longo do tempo,

porém, no 8º dia os “milkfish” morreram por falência metabólica enquanto que as carpas sobreviveram até o final do experimento, mostrando assim a plasticidade fenotípica das carpas em modificar sua temperatura de conforto de forma mais eficiente quando comparado à outra espécie testada.

Em animais de clima temperado marinhos muitos estudos descrevem a expressão gênica e funcional da enzima SCD dessaturase para peixes em ambiente natural e em condições ambientais alteradas (Kraffe, e col., 2007; Buda, e col.,1994; Tocher, e col., 2006; Hazel, e Willians., 1990).

No entanto, para animais nativos de clima tropical poucos trabalhos foram realizados e somente a composição de ácidos graxos teciduais é normalmente avaliada (Andrade e col., 2006), sendo que o único trabalho encontrado a respeito da ação de enzimas dessaturases atuando no metabolismo lipídico de peixes de ambiente tropical nativos da América do sul data de 1976 (Torrengo e Brenner, 1976). Esta escassez de informações reforça a necessidade de trabalhos nesses ambientes, principalmente em ecossistemas com grande ação antrópica, e, mais especificamente tratando de aclimação a mudanças climáticas, sendo que um dos mais importantes e urgentes desafios da fisiologia atual é entender a natureza dos efeitos diferenciais dessas mudanças sobre diferentes espécies.

Os principais desafios enfrentados são: (1) entender como as mudanças ambientais interferem tanto da história de vida de um animal quanto nos níveis populacionais; (2) as vias limitantes as quais os organismos ajustam a sua fisiologia e diminuem o estresse gerado por modificações ambientais nocivas, induzidas ou aceleradas pela ação antrópica, predizendo o intervalo de respostas possíveis a tais mudanças, e finalmente, (3) revelar quais aspectos dos ciclos de vida dos indivíduos de uma população são mais afetados por mudanças ambientais.

Para a resolução de praticamente todos os desafios descritos acima o estudo da regulação da expressão gênica é uma ferramenta útil, principalmente quando se tenta entender qual variação na amplitude de temperatura é necessária para que a resposta de aclimação seja iniciada nas membranas celulares de diferentes organismos e, quais são os sinais reconhecidos e como eles são traduzidos nesse tipo de resposta.

Bibliografia

- Andrade, V. X. L., Moreira, R.G.,Schreiner, M., Scorvo Filho, J. D., Romagosa, E. Influência da dieta no crescimento e na composição dos ácidos graxos de fêmeas de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) criados em tanques-rede. In: Congresso Aquacultura (2006), 2006, Bento Gonçalves (RS). Anais do Congresso Aquacultura 2006. Bento Gonçalves (RS): Aquabio / UFRG.
- Buda, C., Dey, I., Balogh, N., Horvath, L.I., Maderspach, K., Juhasz, M., Yeo, Y.K. and Farkas, T. (1994). Structural

- order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8234–8238.
- Cossins, A.R., Murray, P.A., Gracey, A.Y., Logue, J., Polley, S., Caddick, M., Brooks, S., Postle, T., Maclean, N. (2002). The role of desaturases in cold-induced lipid restructuring. *Bioch. Soc. Transac.* 30, 1082-1086.
- Evans, T., Tomaso, Quail, J., Rogers, A., Gracey, A. R., Cossins, and M. Berenbrink. (2008). Ancient and modern duplication events and the evolution of stearoyl-CoA desaturases in teleost fishes. *Physiol Genomics.* 35, 18-29.
- Hazel, J.R. (1984). Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am. J. Physiol.* 246, 460–470.
- Hazel, J.R. (1989). Cold adaptation in ectotherms: regulation of membrane function and cellular metabolism. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 4, 1–50.
- Hazel, J.R., Williams, E.E. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29, 167–227.
- Hochachka P. W., Somero, G. N. (2002). *Biochemical Adaptation: mechanism and process in physiological evolution.* Oxford University Press, New York, 466p.
- Hsieh, C., Kuo, M. (2005). Stearoyl-CoA desaturase expression and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during cold acclimation. *Comp. Bioch. and Phys.* 141, 95–101.
- Kates, N., Moldoveanu, M., Stewart, L.C. (1993). On the revised structure of the major phospholipid of *Halobacterium salinarium*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1169, 46–53.
- Kraffe, P., Guderley, H. Marty, Y. (2007). Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. *Journ. Experim. Biol.* 210, 149-165.
- Lemieux H, Blier, P.U, Tardif, J.C. (2008). Does membrane fatty acid composition modulate mitochondrial functions and their thermal sensitivities? *Comp Biochem Physiol.* 149, 20-29.
- Los, D.A., Murata, N. (1993). The temperature-dependent expression of the desaturase gene *desA* in *Synechocystis PCC6803*. *FEBS Lett.* 318, 57–60.
- Los, D.A., Murata, N. (1998). Structure and expression of fatty acid desaturases. *Bioch. Bioph. Acta.* 1394, 3-15
- Los, D.A., Murata, N. (2000). Regulation of enzymatic activity and gene expression by membrane fluidity. *Sci. STKE.* pe1. DOI:10.1126. 115, 875-879.
- Murata, N., Wada, H. (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* 308, 1–8.
- Murata, N., Los, D.A., (1997). Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol.*
- Pereira, S.L., Leonard, A.E., Mukerji, P. (2003). Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostagl., Leukotr. and EFA.* 68, 97-106.
- Podrabsky, J.E., Somero, G.N. (2004). Changes in gene expression associated with acclimation to Constant temperatures and fluctuating daily temperatures in a annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Exper. Biol.* 207, 2237-2254.
- Polley, S.D., Tiku, P.E., Trueman, R.T., Caddick, M.X., Morozov I.Y., Cossins, A.R. (2003). Differential expression of cold- and diet-specific genes encoding two carp liver $\Delta 9$ -acyl-coA desaturase isoforms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R41-R50.
- Russel, N.J. (1984). Mechanisms for thermal adaptation in bacteria: blueprint for survival. *Trens Biochem. Sci.* 9, 108-112.
- Schulte, P.M. (2004). Changes in gene expression as biochemical adaptation to environmental change: a tribute to Peter Hochachka. *Comp. Bioch. Physiol.* 139, 519-529.
- Tocher, D. R., Dick, J. R., MacGlaughlin, P., Bell, J. G. (2006). Effect of diets enriched in $\Delta 6$ desaturated fatty acids (18:3n-6 and 18:4n-3), on growth, fatty acid composition and highly unsaturated fatty acid synthesis in two populations of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Comp. Bioch. Physiol.* 144, 245-253.
- Torrenço, M.P., de, and Brenner, R.R. (1976). Influence of environmental temperature on the fatty acid desaturation and elongation activity of fish (*Pimelodus maculatus*) liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 424, 36–44.
- Trueman, R.J., Tiku, P.E., Caddick, M.X. and Cossins, A.R. (2000). Thermal thresholds of lipid restructuring and delta(9)-desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.) *J. of Exper. Biol.* 203, 641-650.