

O gene *TPS1* e seu papel na anidrobiose

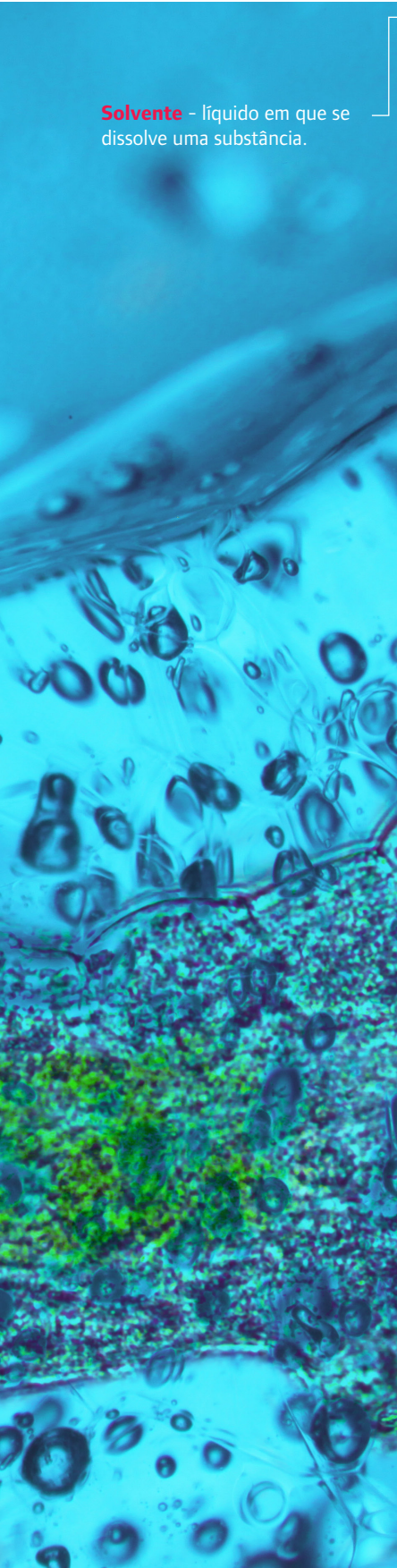
**Danyel Fernandes Contiliani^{1,2}, Vitor Nolasco de Moraes^{1,2},
Yasmin de Araújo Ribeiro^{1,2}, Tiago Campos Pereira^{1,2}**

¹ Departamento de Biologia, FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

² Programa de Pós-Graduação em Genética, FMRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

Autor para correspondência - tiagocampospereira@ffclrp.usp.br

Palavras-chave: dessecação, animação suspensa, trealose, vitrificação, tardígrado, açúcar



Solvente - líquido em que se dissolve uma substância.

A vida sempre foi relacionada a um **solvente** orgânico que participa, de forma essencial, de processos biológicos celulares e sistêmicos: a água. Entretanto, algumas poucas espécies são capazes de sobreviver por longos períodos de seca em condições ambientais desafiadoras, por meio de um estado conhecido como anidrobiose. Em leveduras, essa tolerância ao estresse é parcialmente promovida pela expressão do gene *TPS1*, um dos elementos responsáveis pela via de biossíntese do açúcar trealose. Por sua vez, em situações de seca, a trealose age de maneira protetora nas células, impedindo a degradação de macromoléculas e danos permanentes às estruturas celulares, garantindo a recuperação das funções biológicas após a reidratação dessas células. Devido a essa capacidade, o gene *TPS1* e a trealose propriamente dita têm sido elementos-chave de diversas aplicações biotecnológicas nas ciências agrárias e médicas.

Vida na ausência de água

Frequentemente, a água é considerada como a matriz da vida e, portanto, indispensável para a sua ocorrência. Afinal, cerca de 60% da nossa massa corpórea corresponde à água. De fato, neste exato momento, inúmeras moléculas de água (H₂O) estão participando de reações bioquímicas que acontecem no organismo do leitor e em parte, por formação de ligações de hidrogênio. Essas reações não ocorreriam na ausência de H₂O, uma vez que esta age como um solvente orgânico e universal para o metabolismo adequado do nosso organismo. Entretanto, a incrível natureza do planeta Terra abriga algumas espécies que são capazes de sobreviver com apenas 0,1% da água corporal em situações de escassez hídrica, a dessecação extrema. Estes organismos podem ser bactérias, fungos, protistas, plantas e animais invertebrados. Um exemplo presente em nosso dia a dia é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, popularmente conhecida como fermento biológico e comercializada a seco em supermercados.

Em 1702, uma descoberta marcante foi primeiramente relatada pelo microbiologista

Antony van Leeuwenhoek, enquanto analisava amostras secas de seu telhado por meio de seu microscópio. Inicialmente, Leeuwenhoek não observava nada além do esperado, apenas a poeira acumulada por tempos. De forma inesperada, alguns minutos após a adição de água às amostras, o cientista notou sinais de vida - pequenos organismos se movimentando. Ele os denominou 'animálculos', e deduziu que eles haviam sido preservados a seco naturalmente, em meio ao material que ele estava analisando. Quase dois séculos após essa descoberta, o zoologista Alfred Giard deu o nome de 'anidrobiose' (do grego, vida sem água) a esse estado dessecado, porém reversível, que alguns organismos conseguem permanecer em caso de seca extrema.

Organismos anidrobiontes (Figura 1) são capazes de se manter preservados a seco por ordem de décadas e até milênios, sem apresentar sinais de vida, em condições extremamente desafiadoras, como extremos de temperatura (~ **0 Kelvin** a + 151 °C), radiação ultravioleta, altas pressões hidrostáticas e vácuo. De forma reversível, quando as condições ambientais voltam a ser favoráveis, assim como a chuva após a estiagem, esses organismos são reidratados, suas taxas metabólicas normais são retomadas, desenvolvem-se e até mesmo se reproduzem.

Organismos anidrobiontes

- seres que são capazes de perder praticamente toda a água de seus corpos diante de situações de seca extrema. Nesse estado totalmente desidratado, o organismo não apresenta quaisquer atividades bioquímicas, celulares ou de metabolismo, porém pode retornar à vida após reidratação.

Zero Kelvin ou zero absoluto equivale a -273,15 °C da escala Celsius.

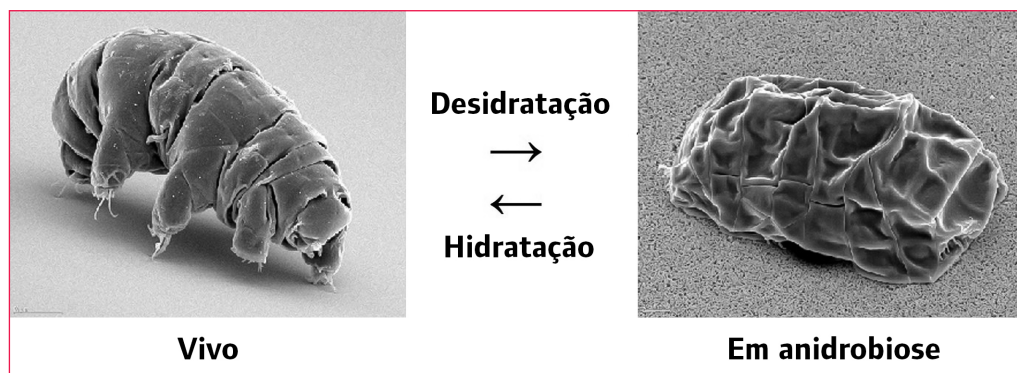


Figura 1.

O tardígrado é uma espécie de animal anidrobionte de aproximadamente 0,5 milímetro. Na esquerda, observa-se o animal ativo (hidratado); à esquerda, em anidrobiose (dessecado). Imagem de uso livre (CCBY), adaptada de Schokraie et al. (2010). PLoS ONE 5(3): e9502. doi:10.1371/journal.pone.0009502.

Por trás do fenômeno da anidrobiose existe um universo de estratégias genéticas e adaptações fisiológicas que atuam de forma protetora nas células desses organismos tão resistentes como, por exemplo, a produção de certas biomoléculas específicas e o envolvimento de uma maquinaria de reparo do DNA. Neste texto, mostramos, de forma

específica, como a produção e a atividade de uma enzima chamada trealose-6-fosfato sintase (TPS) está envolvida na proteção das células de algumas espécies, em cenários tão desafiadores para a vida, como a dessecação extrema, a partir do acúmulo de um açúcar chamado trealose.

O gene *TPS1*

Organismo-modelo - espécie não humana geralmente utilizada como alvo de estudos comparativos, por exemplo, rato, camundongo e mosca das frutas.

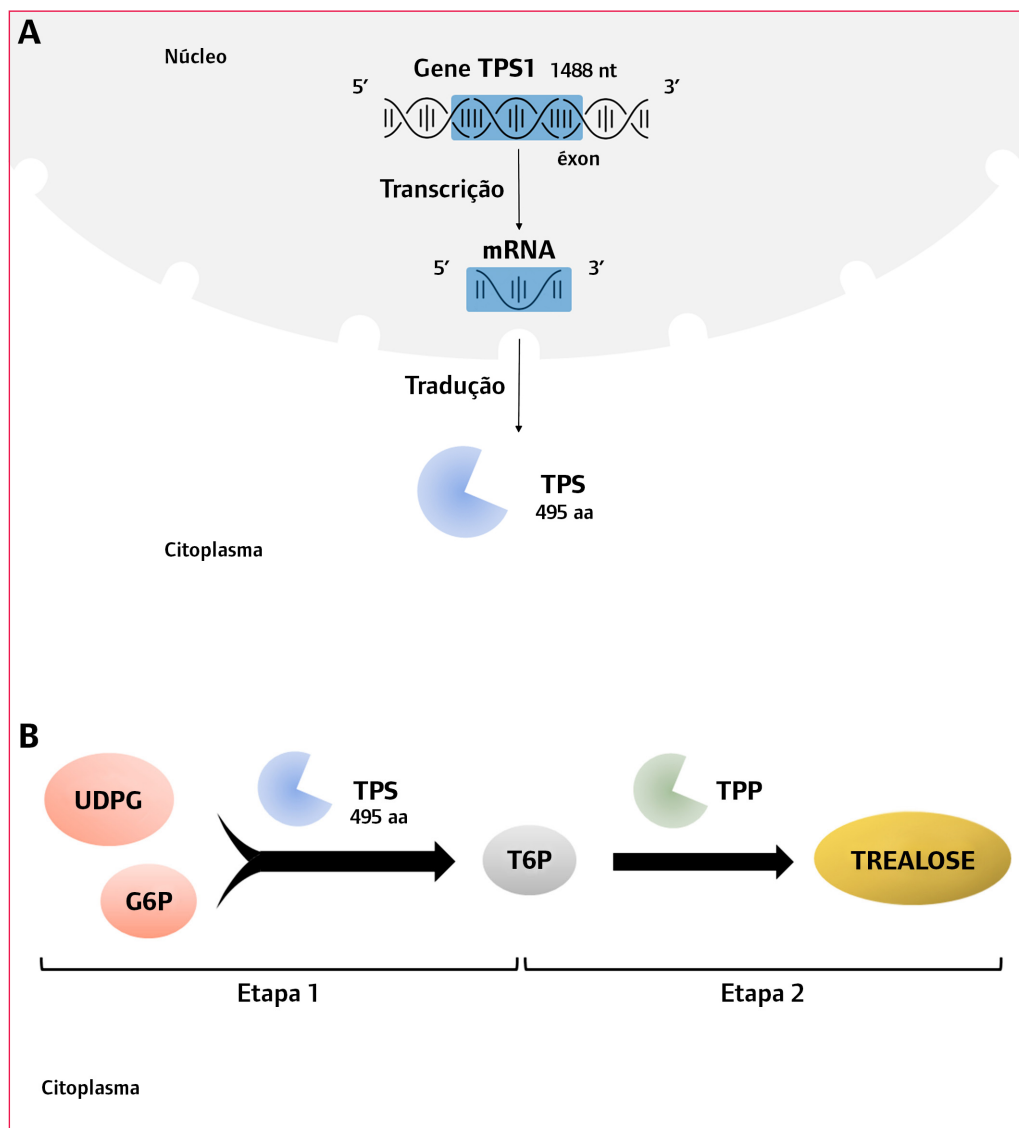
Estudos bioquímicos e genéticos da levedura *S. cerevisiae*, como **organismo-modelo**, revelaram que a via metabólica para a produção de trealose envolve um complexo de sete genes, sendo o gene *TPS1* (do inglês, *trehalose-6-phosphate synthase 1*) elementar para o processo.

De acordo com o banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; Rockville Pike, Bethesda MD, EUA), o gene *TPS1* (Gene ID: 852423) de *S. cerevisiae* está localizado no cromossomo II e possui um único éxon, com total de 1488 nucleotí-

deos (nt). O produto desse gene é a enzima trealose-6-fosfato sintase (TPS), com um conteúdo total de 495 resíduos de aminoácidos (aa), considerada fundamental para síntese bioquímica da trealose (Figura 2A).

Em bactérias, leveduras e plantas, a síntese da trealose é um processo de duas etapas (Figura 2B). Inicialmente – etapa 1 – a enzima TPS interage com as moléculas glicose-6-fosfato (G6P) e uridina difosfato-glicose (UDPG), catalisando a transferência de glicose de UDPG para G6P e, portanto, a formação de trealose-6-fosfato (T6P). Em seguida – etapa 2 –, uma outra enzima, a trealose fosfatase (TPP), interage com a molécula de T6P, convertendo-a em trealose.

Figura 2. Síntese de trealose em eucariontes. **A)** O gene *TPS1* possui um único éxon com total de 1488 nucleotídeos. Após os processos de transcrição e tradução, o produto desse gene é uma proteína com 495 aminoácidos, a trealose-fosfato-sintase (TPS), que atua na síntese de trealose. **B)** A síntese de trealose é dividida em duas etapas. Etapa 1 - o produto do gene *TPS1*, a enzima trealose-fosfato-sintase (TPS), utiliza os açúcares glicose-6-fosfato (G6P) e uridina difosfato-glicose (UDPG), produzindo trealose-6-fosfato (T6P) e uridina difosfato (UDP; não mostrada). Etapa 2 - a enzima trealose fosfatase (TPP) converte T6P em trealose. Imagem construída por Ribeiro Y.A., utilizando elemento gráfico da *Noun Project* (DNA por Linseed Studio).



Trealose e seu papel fisiológico

Dissacarídeo não redutor - união de dois açúcares simples, monossacarídeos, por uma ligação covalente O-glicosídica. Limitando-se à forma cíclica, fechada, um dissacarídeo não-redutor não apresenta um grupo cetona ou aldeído como agente redutor e, assim, é impedido de sofrer oxidação, isto é, doar elétrons para outras moléculas. Sua estrutura molecular só adquire a forma aberta, com grupamentos livres para sofrer oxidação, a partir da quebra, na hidrólise.

Não higroscópico - que não absorve água do ambiente.

Vitrificação - processo no qual o citoplasma é substituído por uma matriz orgânica sólida, tal como um vidro.

Descoberta em 1832 por H.A.L. Wiggers, a trealose consiste em um **dissacarídeo não redutor**, formado por duas moléculas de glicose unidas por uma **ligação glicosídica**, o que a torna uma molécula consideravelmente estável e permitindo que ela interaja com outras diversas macromoléculas. Sua decomposição, facilitada pela enzima trealase, resulta na produção de duas moléculas de glicose, servindo de fonte energética e nutritiva em diversas espécies de bactérias, fungos, plantas e animais invertebrados.

De forma interessante, os aspectos estruturais da trealose são considerados únicos dentre outros açúcares comuns. Seus cristais são de natureza **não higroscópica e amorfa**. Além disso, em estado seco, sua estabilidade é mantida sob condições de altíssimas temperaturas por tempos indefinidos – de meses a anos. Considerando essas características, a trealose é capaz de atuar como um estabilizador, sem reagir com as demais moléculas, e crioprotetora em células que se encontram em seca, atuando como um agente importante para o fenômeno da anidrobiose.

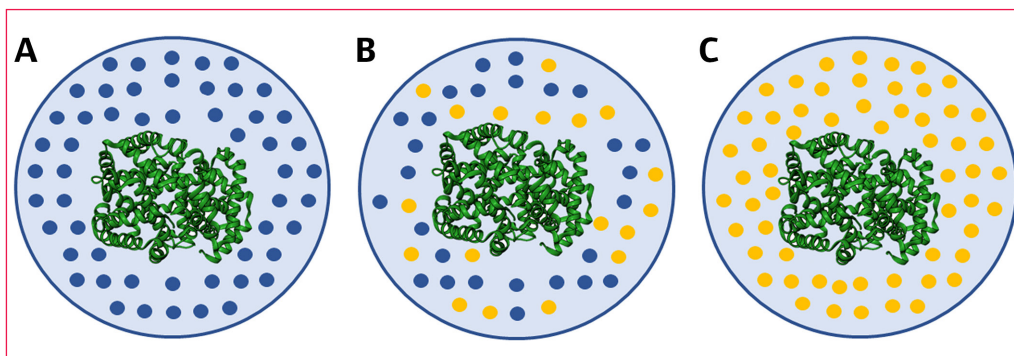
Uma vez estando em um cenário de sequidão (pouca umidade no ar), os organismos anidrobiontes começam a ter perdas excessivas de água, desidratam-se e, como uma resposta fisiológica a esse estresse hídrico, o gene *TPS1* tem sua expressão induzida. A indução na expressão gênica resulta no aumento considerável de seu produto (TPS) e, conseqüentemente, no aumento de trealose dentro das células (Figura 3). Nesse contexto, existem dois possíveis mecanismos concomitantes que explicam como o acúmulo de trealose atua diretamente na proteção de biomoléculas (e.g., DNA, RNA, proteínas) e estruturas celulares: (i) substituição de água e (ii) **vitrificação**.

Ligação glicosídica - ligação covalente entre dois monossacarídeos; formada quando um grupo hidroxila de uma molécula de açúcar reage com o carbono anomérico (*i.e.*, carbono 1) de outro.

Amorfo - sem forma ou organização determinada.

Figura 3. Manutenção da estabilidade de macromoléculas durante o processo de dessecação.

Observar o citoplasma da célula (região dentro do círculo) ao longo do processo. **A)** Condição normal de uma célula hidratada (pontos azuis representam moléculas de H₂O). **B)** Conforme ocorre a perda excessiva de água (desidratação), a síntese de trealose (pontos alaranjados) é induzida. **C)** Condição de dessecação extrema em que o acúmulo de moléculas de trealose promove a estabilidade termodinâmica de macromoléculas gerais (estrutura central em verde). Imagem construída por Contiliani D.F., a partir de Soman, J. e Olson J.S. DOI: 10.2210/pdb4MQJ/pdb.





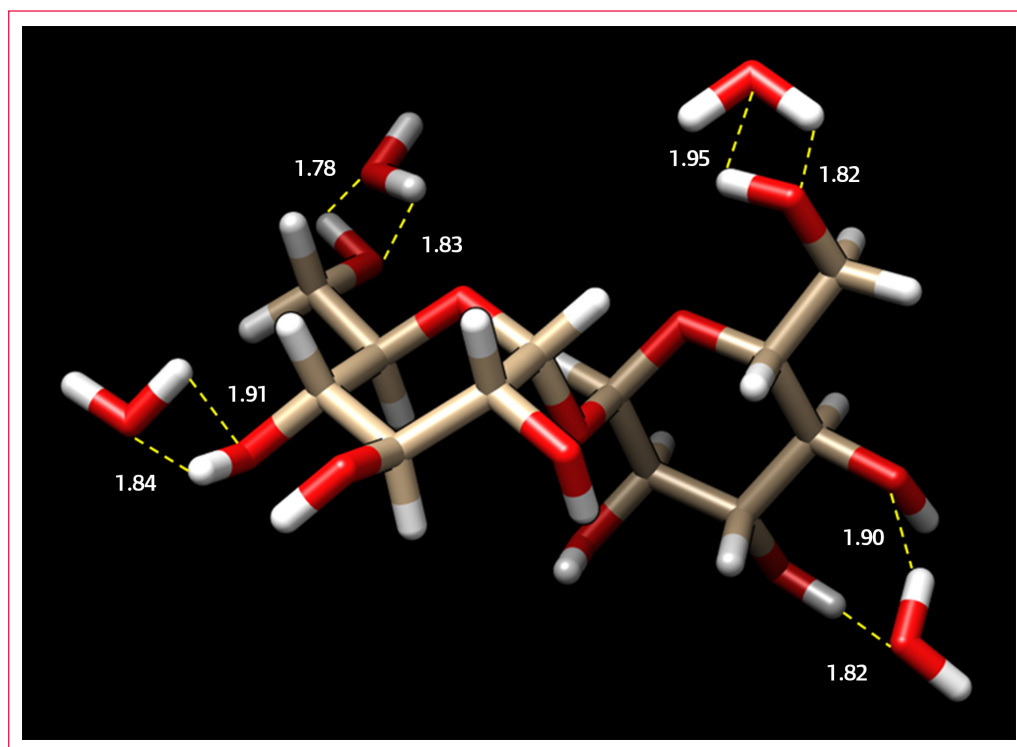
Em condições normais, todas as macromoléculas são geralmente estabilizadas por moléculas de H₂O que realizam ligações de hidrogênio ao redor dessas moléculas, formando uma camada de hidratação. O primeiro mecanismo – substituição de água – ocorre quando a célula se encontra em processo de dessecação e chega a perder (quase totalmente) seu

conteúdo de água. Após a síntese exacerbada de trealose, seu acúmulo no interior celular ocupa o espaço que antes era tomado por moléculas de H₂O. Assim, as moléculas de trealose também interagem com as macromoléculas por ligações de hidrogênio (Figura 4), de uma maneira parecida com as moléculas de H₂O, estabilizando toda a matriz celular.

Figura 4.

A trealose pode realizar ligações de hidrogênio com biomoléculas de forma semelhante à água.

A imagem ilustra ligações de hidrogênio (linhas tracejadas amarelas) entre a trealose (estrutural molecular maior) e quatro moléculas de água (em formato de "v", nos quatro cantos da imagem), em que suas distâncias atômicas são representadas numericamente em **ångström** (Å). Observe que tanto as moléculas de água quanto a trealose podem realizar essas ligações de hidrogênio com diversas biomoléculas (proteínas e DNA). Imagem: Danyel Fernandes Contiliani, por meio do software aberto UCSF Chimera 1.4.



Ångström - equivalente a 10^{-10} metro.

O segundo mecanismo – vitrificação – consiste na formação de uma espécie de biovidro no interior das células em decorrência do acúmulo de trealose. Esse biovidro consiste de uma matriz fluída de alta viscosidade capaz de paralisar todas as reações químicas, estabilizando todas as biomoléculas por longos períodos a seco. Além disso, esse processo impede a formação de cristais de água, evitando o rompimento das células. Quando essas células são reidratadas, o metabolismo normal da célula é retomado.

Trealose e biotecnologia

A elucidação da via bioquímica de síntese da trealose abriu portas para diversos avanços tecnológicos na produção industrial em larga escala desse açúcar. Assim, o aprimoramento dos processos de produção permitiu a expansão de estudos sobre a trealose e de suas aplicações na ciência e na indústria.

Na indústria alimentícia, a trealose é utilizada na preservação de alimentos a seco e congelados, mantendo diversos aspectos importantes em relação à qualidade, como em relação à quantidade de nutrientes, a cor e o sabor. Na indústria de cosméticos, atua impedindo a emissão de odores do corpo humano, mas também seu caráter não higroscópico é considerado para a preservação e eficiência de cremes e desodorantes, bloqueando a retenção de umidade. Na área da saúde, a trealose também teve sua eficácia testada para diversos usos, como a preservação de órgãos e tecidos a seco e congelados, no tratamento contra perda mineral óssea e de forma atenuante dos sintomas de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e doença de Huntington. Por fim, na área agrícola, a trealose é utilizada para aumentar a preservação de plantas ornamentais comercializadas e seu gene codificador *TPS1* é utilizado na produção de plantas transgênicas resistentes a estresses **abióticos** (e.g., seca, frio).

Embora a trealose possua um grande potencial biotecnológico para a aplicação em diversas áreas, seus mecanismos fisiológicos em humanos, incluindo seus papéis no tratamento de doenças (citadas anteriormente), ainda se mantêm pouco compreendidos. Portanto, a partir do surgimento de mais estudos bioquímicos da trealose, novos *insights* poderão abrir portas para novas aplicações biotecnológicas.

Conclusão

A identificação do gene *TPS1*, por volta dos anos 1990, permitiu desvendar os processos fisiológicos e metabólicos do açúcar trealose em uma diversidade de organismos, atuando em diferentes papéis biológicos, de reserva energética em vespas ao papel **osmoprotetor**

Osmoprotetor - classe de pequenas moléculas orgânicas que auxiliam o organismo a sobreviver ao estresse osmótico causado pelo desequilíbrio de água no interior da célula.

Abióticos - conjunto de fatores físicos e químicos (não biológicos).



em cenários de anidrobiose. Em particular, o papel da trealose na anidrobiose ocorre, de forma fundamental, gerando uma estabilidade molecular nas células em situações de escassez de água. Para tal, a expressão do gene *TPS1* é fortemente induzida à medida que as células são desidratadas. Devido a esse mecanismo natural, a trealose tem sido alvo de muitas aplicações biotecnológicas, uma vez

que a preservação de materiais biológicos a seco e a criação de plantas resistentes à seca são de grande interesse econômico. Nesse sentido, o fomento à pesquisa científica sobre genes associados à trealose e o desenvolvimento de tecnologias baseadas nas particularidades físico-químicas desse açúcar poderão impactar áreas essenciais para a sociedade, como a agricultura e a medicina.



Para saber mais

CAI, X.; SEITL, I.; MU, W.; ZHANG, T.; STRESSLER, T.; FISCHER, L.; JIANG, B. Biotechnical production of trehalose through the trehalose synthase pathway: current status and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 102, n. 7, p. 2965-2976, 2018.

KONDRAK, M.; MARINCS, F.; KALAIPOS, B.; JUHASZ, Z.; BANFALVI, Z. Transcriptome analysis of potato leaves expressing the trehalose-6-phosphate synthase 1 gene of yeast. *PLoS one*, v. 6, n. 8, 2011.

TUNNACLIFFE, A.; LAPINSKI, J. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 358, n. 1438, p. 1755-71, 2003.