

**ANIELI CRISTINA MARASCHI**

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE (HSP70) NO CAMARÃO  
DULCÍCOLA EURIHALINO *Macrobrachium acanthurus* SUBMETIDO A  
ESTRESSE TÉRMICO**

**CURITIBA  
2012**

**ANIELI CRISTINA MARASCHI**

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE (HSP70) NO CAMARÃO  
DULCÍCOLA EURIHALINO *Macrobrachium acanthurus* SUBMETIDO A  
ESTRESSE TÉRMICO**

**Monografia apresentada à disciplina de  
Estágio em Fisiologia como requisito parcial  
à conclusão do Curso de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Prodocimo**

**CURITIBA  
2012**

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Prodocimo, pela oportunidade, orientação e acompanhamento durante esses três anos de estágio que resultaram nesse trabalho e em uma enorme aprendizagem.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Arruda de Oliveira Freire pela colaboração, oportunidade e principalmente pela confiança em me inserir na continuação do seu projeto que resultou na minha monografia.

A minha família, especialmente minha mãe Angélica e irmão João Gabriel pelo apoio nos inúmeros momentos em que eu estive ausente e pela paciência e apoio nos momentos difíceis.

Aos grandes amigos que compartilharam comigo os melhores e os piores dias desses longos quatro anos, principalmente meus queridos “Perciformes”.

À amiga, e hoje professora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enelise Amado pela parceria no projeto e pela companhia nos dias intensos de trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação, Silvia, Luciana, Giovanna, Natascha, Juliane e Marcos, pelo apoio e amizade durante todos esses anos de convivência.

A você, que me apoiou mesmo durante minha ausência, falta de paciência. E esteve ao meu lado, mesmo longe, via internet ou durante a madrugada.

E a todos os amigos e colegas, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos</b> .....	III
<b>Sumário</b> .....	IV
<b>Resumo</b> .....	V
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1 Caracterização da espécie.....	3
1.2 Proteínas de estresse térmico (Heat Shock Proteins - HSPs).....	4
<b>2. Objetivos</b> .....	5
<b>3. Material e Métodos</b> .....	6
3.1 Coleta e aclimatação.....	6
3.2 Experimentação.....	6
3.3 Obtenção das amostras.....	6
3.4 Expressão de proteínas (HSP70) por Western Blotting.....	7
3.5 Análise estatística.....	8
<b>4. Resultados</b> .....	9
<b>5. Discussão</b> .....	10
<b>6. Conclusão</b> .....	13
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	14

## RESUMO

No contexto de mudanças climáticas, estudar os impactos do aumento da temperatura sobre os ecossistemas e seus efeitos sobre os organismos é de grande importância. Organismos aquáticos dependem de uma faixa de temperatura ideal da água para que suas funções fisiológicas sejam compatíveis com a vida. A essa capacidade de suportar amplas variações de temperatura no ambiente denominamos euritermia. Para isso os organismos contam com mecanismos de ajustes que mantenham a viabilidade e integridade de suas funções fisiológicas. A resposta ao choque térmico (HSR, do inglês *Heat Shock Response*) é caracterizada por desencadear mecanismos moleculares que compensem os distúrbios causados pelo aumento ou diminuição da temperatura. A rápida transcrição e tradução de uma série de proteínas de choque térmico da família das HSPs (do inglês *Heat Shock Protein*), como a HSP70, representa uma das respostas celulares ao estresse térmico. O aquecimento global traz inúmeros efeitos sobre todas as espécies de todos os ecossistemas. Logo, espécies aquáticas, e muitas de interesse econômico como o camarão *Macrobrachium acanthurus* utilizado nesse trabalho, também poderão sofrer efeito. O estudo da expressão das HSPs contribui na avaliação do estresse causado pelo aumento de temperatura e ajuda a definir como os organismos respondem a esse choque. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta temporal do efeito do estresse térmico no camarão de água doce eurihalino *Macrobrachium acanthurus* através da expressão de proteínas de estresse térmico (HSP70) utilizando a técnica de Western blotting. Os resultados apontam um aumento significativo nos níveis de expressão de proteínas Hsp70 em 3 horas de exposição a 30°C ( $50,19 \pm 5,56$ ) em relação ao grupo controle ( $36,38 \pm 2,46$ ) mantido em temperatura de aproximadamente 20°C. Quando expostos por 24 e 120 horas a 30°C a densidade das bandas de músculo de *M. acanthurus* foi de  $43,46 \pm 3,9$  e  $44,74 \pm 2,6$ , respectivamente, e não ocorrendo aumento quando comparado ao grupo controle. A espécie é euritérmica e utilizando mecanismos moleculares de ajustes, pode aumentar os níveis de síntese de HSP70 de acordo com a temperatura de choque térmico em que é submetido. Esse aumento na expressão pode variar de acordo com a temperatura de aclimação em que os organismos foram mantidos. Com padrões que correspondem a animais de ambientes térmicos moderadamente variáveis a espécie *M. acanthurus* sofreria com menor intensidade os efeitos das mudanças climáticas, devido aos mecanismos de resposta ao choque térmico

e aumento dos níveis de síntese de HSP70, mantendo assim a homeostase diante os desafios térmicos encontrados.

## 1. Introdução

Fenômenos naturais, como as mudanças climáticas, podem ser reconhecidos desde épocas primitivas da história da Terra. Em milhões de anos o planeta sofreu resfriamentos (glaciações) e aquecimentos sucessivos, geralmente em padrões cíclicos, até se alcançar o período pós-glacial em que o clima tornou-se ideal para a vida existente (Sugiuo, 2008). A temperatura então pode se alterar drasticamente ao longo de centenas ou milhares de anos. Essas alterações climáticas que ocorreram ao longo dos períodos geológicos tiveram um papel significativo na evolução, o que pode ter influenciado a radiação adaptativa e, em alguns casos, levado às grandes extinções (Willmer *et al.*, 2005).

Os organismos, em geral, enfrentam variações térmicas em ciclos circadianos ou sazonais. Eles apresentam intervalos de condições ambientais aos quais são melhores adaptados, uma faixa ótima em que melhor desempenham suas propriedades fisiológicas e ecológicas. Assim, as mudanças de temperatura representam um verdadeiro desafio para os animais (Begon *et al.*, 2007; Willmer *et al.*, 2005). Alguns animais, entretanto, respondem a alterações ambientais que não correspondem a sua faixa ótima, habitam ambientes muito instáveis, como é o caso dos estuários e costões rochosos, que sofrem ação diária das marés e, entre outras variáveis, apresentam períodos de frio ou calor muito intensos (Begon *et al.*, 2007; Willmer *et al.*, 2005).

Para animais aquáticos, a temperatura da água é de extrema importância para manutenção da homeostase dos animais. Quando esses animais se distanciam da sua faixa de temperatura ótima, mecanismos são ativados para que mantenham a integridade de sua maquinaria celular e a funcionalidade das reações químicas (Willmer *et al.*, 2005). Todos os organismos possuem alguma capacidade comportamental, características fisiológicas ou morfológicas em resposta a temperatura do ambiente. Essa plasticidade fenotípica pode ser dita como aclimação térmica (Angilleta, 2009). O potencial de aclimação térmica difere entre as espécies, podendo assim classificar os organismos em estenotérmicos, os quais apresentam limites estreitos de tolerância à variação, e em euritérmicos, que apresentam limites de tolerância mais extensos (Schmidt-Nielsen, 2002; Tomanek, 2008; Somero, 2010).

Quando os animais se deparam com situações em que a temperatura se distancia da sua faixa ótima, na qual o organismo pode sobreviver indefinidamente e apresenta as melhores condições de reproduzir e se desenvolver. Por exemplo, aumentos de temperatura, determinadas características podem ser alteradas, como padrões de

crescimento, reprodução, natação, fuga, além de prejudicar atividades fisiológicas, como exemplo a integridade de proteínas e enzimas (Schmidt-Nielsen 2002; Willmer *et al.* 2005).

Invertebrados em geral são classificados como ectotérmicos e poicilotérmicos, ou seja, sua temperatura corporal oscila de acordo com a variação da temperatura do ambiente e não possuem um mecanismo para controle interno do calor (Schmidt-Nielsen, 2002). Sendo assim, para esses animais, a temperatura do ambiente influencia diretamente suas funções biológicas e para invertebrados aquáticos, aumento ou queda da temperatura da água podem causar disfunções fisiológicas graves.

Mecanismos fisiológicos de proteção dos animais são ativados para manter a homeostase corporal e garantir o equilíbrio de suas funções fisiológicas quando encontram situações de aumento de temperatura. A resposta ao choque térmico (HSR) (do inglês *Heat Shock Response*) é caracterizada pela rápida transcrição e tradução de uma série de proteínas da família das “proteínas de choque térmico” (HSPs) (do inglês *Heat Shock Protein*), que atuam garantindo a integridade e a viabilidade celular, compensando assim as perturbações causadas pelo aumento ou diminuição da temperatura ambiental no organismo e sua síntese pode acontecer tanto em condições de variação de temperatura, quanto de demais estados de alterações homeostáticas, tais como variação de salinidade, exposição a metais pesados, hipóxia, estresse oxidativo, entre outros agentes (Schlesinger 1986; Feder *et al.* 1995; Feder and Hofmann 1999; Yenary *et al.* 1999). Dentre as famílias de HSPs, a mais comumente utilizada como biomarcador é a HSP70 (70 kDa), devido a sua rápida e significativa expressão frente uma gama de estressores (Jonsson *et al.* 2006).

O aquecimento global é um fenômeno natural, e vários fatores contribuem para o aumento da temperatura do planeta, mas a principal causa da sua intensificação é a ação antrópica (Le Treut *et al.*, 2007; IPCC, 2007). Entre 1901 e 2005 a temperatura média global subiu cerca de 0,7°C. Pesquisas apontam que a temperatura atmosférica sofrerá aumento de aproximadamente 1,1 – 6,5°C até 2100, e a temperatura do oceano aumentará cerca de 0,5 – 2,5°C até o fim do século 21. Para rios e riachos a previsão é de um aumento de 1 – 3°C (IPCC, 2007).

As consequências do aumento da temperatura nos ecossistemas aquáticos são inúmeras. Portanto, as espécies estenotérmicas, ou com menor tolerância térmica, serão mais suscetíveis a extinções locais (Tomanek, 2010). Ao considerar ecossistemas, as espécies que habitam ambientes muito estáveis ou altamente variáveis poderão ser mais

atingidas pelo aquecimento global do que as espécies de ambientes moderadamente variáveis (Somero, 2010; Tomanek, 2010).

No contexto de mudanças climáticas, o conhecimento das limitações térmicas em organismos aquáticos é de grande importância, uma vez que a temperatura tem influência direta sobre sua fisiologia. Quando a espécie tratada possui um potencial para aquicultura, como a espécie *Macrobrachium acanthurus* utilizada nesse trabalho, aumenta-se o interesse em obter informações sobre sua ecofisiologia, para a aplicação de novas tecnologias para cultivo e também prever o impacto sobre sua fisiologia, analisando a expressão de proteínas de estresse (HSP70), frente às alterações climáticas previstas.

### 1.1 Caracterização da espécie

As espécies do gênero *Macrobrachium*, pertencentes à família Palaemonidae, caracterizam-se pela ampla distribuição mundial nas águas doces e salobras. Espécies do gênero *Macrobrachium* possuem representantes de regiões tropicais e temperadas (Ruppert *et al.*, 2005). As espécies dulcícolas costeiras, que sofrem influência marinha, migram nos rios litorâneos e dependem das águas salobras e da temperatura para seu desenvolvimento larval (Rodríguez, 1981; Quadros, 2002). A espécie tratada nesse estudo, *Macrobrachium acanthurus* (Fig. 1), encontra-se em água doce próxima a estuários, mas é dependente da água salobra para reprodução e desenvolvimento larval, assim como as outras espécies pertencentes ao gênero. Apresenta grande porte, altas taxas de fertilidade e fecundidade, raras incidências de doenças, fácil manutenção e reprodução em cativeiro. Em condições naturais a espécie habita águas de temperatura que varia entre 21 e 27°C ao norte (Pinheiro, 1983) e 16 e 26°C ao sul do Brasil (Muller e Prazeres, 1987).

Devido a essas características, tem relevante interesse comercial e, em várias regiões, a espécie é bastante explorada e utilizada como “isca viva” pelas populações ribeirinhas na pesca (Choudhury, 1970; New, 1995).



**Figura 1.** Exemplar da espécie *Macrobrachium acanthurus*.

## 1.2 Proteínas de estresse térmico (Heat Shock Proteins – HSPs)

A resposta ao choque térmico tem sido caracterizada em inúmeras espécies e em resposta a diferentes estressores. Essas respostas variam entre as espécies que habitam diferentes tipos de ambientes. Em organismos aquáticos, animais que habitam ambientes estáveis, variáveis ou moderadamente variáveis apresentam diferentes tipos de resposta ao choque térmico (Tomanek, 2008).

A resposta mais comum é a síntese preferencial de um grupo de proteínas, que atuam como chaperonas moleculares, as proteínas de estresse térmico (HSPs). As HSPs auxiliam no correto dobramento de proteínas durante a tradução e também facilita o transporte de proteínas através da membrana em condições normais da célula. Em condições de estresse elas atuam renaturando e redobrando proteínas que podem ter sido desnaturadas. Caso a situação de desnaturação seja irreversível, as chaperonas moleculares destinam tais proteínas à maquinaria proteolítica da célula (revisado em Tomanek 2010).

As HSPs, em sua maioria, pertencem as famílias das grandes proteínas de até 100 kDa (HSP100, HSP90, HSP70 e HSP60), as quais são altamente conservadas entre as espécies (Lindquist e Craig, 1988; Feder *et al.*, 1995; Patruno *et al.*, 2001; Yenary *et al.*, 1999). Por exemplo, as HSP70 humanas são homólogas em 73% com as de *Drosophila* e 50% com as de *E. coli* (Feder *et al.*, 1995). Dentre a família das HSPs, a HSP70

apresenta síntese rápida e significativa diante de diferentes estressores, por isso, é a mais utilizada como biomarcador (Jonsson *et al.*, 2006).

O estudo do estresse fisiológico através da análise das HSPs são ferramentas úteis para quantificar e prever níveis de estresse dos organismos. Podendo assim compreender as alterações ambientais que limitam a distribuição dos organismos e quanta variação suportariam diante de uma situação de estresse (Tomanek, 2008).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta temporal do efeito do estresse térmico no camarão de água doce eurihalino *Macrobrachium acanthurus*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Testar a resistência dos animais ao aumento de temperatura e quantificar as respostas fisiológicas por meio da expressão de proteínas de estresse térmico (HSPs), utilizando a técnica de Western Blotting;
- Fazer inferências quanto a sua resistência a possíveis alterações climáticas do ambiente.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Obtenção dos animais e aclimação

Adultos de *Macrobrachium acanthurus* foram obtidos no município de Pontal do Paraná, Paraná, junto a pescadores, e logo após foram colocados em galões plásticos, com aeração constante, para serem transportados até o laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba-PR. No laboratório os animais foram mantidos aclimatados por 7 dias em aquários com água doce filtrada com temperatura de aproximadamente 20°C, aeração constante e salinidade igual a do local de origem. Os animais foram alimentados a cada 48 h com ração moída para peixe (32% de proteína).

#### 3.2 Experimentação

Após o período de aclimação, os espécimes de *M. acanthurus* foram expostos à temperatura de 30°C, por 3, 24 e 120 horas, em aquários de 1 L, aeração constante, salinidade < 0,5‰. Em cada aquário e para cada tempo de exposição foram, colocados 1 ou 2 indivíduos, repetindo esse procedimento por 3 a 5 vezes, constituindo grupos com 4-6 animais para cada tempo. O grupo controle foi mantido por 3 horas na mesma situação em que os grupos experimentais, porém com igual temperatura da água a do aquário estoque.

A temperatura da água foi mantida em ~30°C através de termostato colocado na água do aquário em que os aquários experimentais estavam imersos (Termostato Roxin – HT – 1900 – 50W).

#### 3.3 Obtenção das amostras

Após experimento, os camarões foram anestesiados em gelo e então a corda nervosa ventral foi seccionada entre o cefalotórax e o abdômen. Então, após a remoção da carapaça, foram retiradas amostras de musculatura da região abdominal dos animais em situação controle e experimentais.

Em seguida foram homogeneizadas (mini homogenizador TECNAL – TE-103) em tampão de lise, contendo HEPES (20 mM), NaCl (15 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), EDTA (1 mM), glicerol (10%), NP40 (10%), Triton X100 (1%) e os inibidores de protease: 2-fenantrolina (1-10 mM), iodoacetamida (1-10 mM), fluoreto de sulfonil fenilmetano (0,1-1 mM), N-ethyl maleimida (1mM), benzamidina (10 mM). O homogeneizado foi então centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, em 4°C. O sobrenadante foi então retirado e separado em alíquotas para determinação de proteínas totais utilizando o método descrito por Bradford (1976) através de leitura em microplaca em leitor de ELISA a 595 nm.

### 3.4 Expressão de proteínas (Hsp70) por Western Blotting

As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, com sulfato de sódio-dodecil (SDS-PAGE). Uma alíquota do extrato de proteínas (contendo 200µg de proteína total) foi diluída em tampão de amostra (2:1) e em seguida submetida a um gel de empilhamento (acrilamida 5%) em tampão Tris contendo SDS (pH 6,8 ajustado com solução concentrada de Glicina) seguido do gel de separação (acrilamida 10%) também em tampão Tris contendo SDS (pH 8,8 ajustado com solução concentrada de Glicina). A corrida se processou com a utilização de tampão de corrida Tris-Glicina (pH 8,3) contendo SDS. O tempo de duração da corrida de eletroforese durou aproximadamente 4 horas com corrente constante de 30 mA (Amersham Pharmacia Biotech EPS 300). Imediatamente após a corrida os peptídios do gel foram transferidos para membrana de nitrocelulose em câmara de Western Blotting contendo tampão de transferência (Tris-Base 25mM, Glicina 192mM, SDS 10%, metanol 20%), com 145 mA de corrente, 25-30 V, por aproximadamente 16 horas. A membrana contendo as proteínas foi incubada com tampão TBST contendo leite Molico Nestlé® (com baixo teor de gordura) por 45-60 minutos para bloqueio de sítios não específicos. O material foi então incubado por 1 hora na presença do anticorpo primário anti-HSP70 (BD Biosciences) a 20°C. Em seguida o material foi retirado e incubado com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina em tampão TBST contendo leite Molico Nestlé por 1 horas em temperatura ambiente. A membrana foi então lavada 3 vezes com tampão TBST por 5-10 minutos cada. Em seguida o material foi transferido para o tampão ótimo para fosfatase alcalina contendo substratos para a fosfatase alcalina (cromógenos) BCIP e NBT, permanecendo nesta solução até o aparecimento das bandas das proteínas. Após o aparecimento das bandas, a membrana de nitrocelulose foi mergulhada em água

destilada para parar a reação. A intensidade das bandas foi quantificada pelo programa ImageJ.

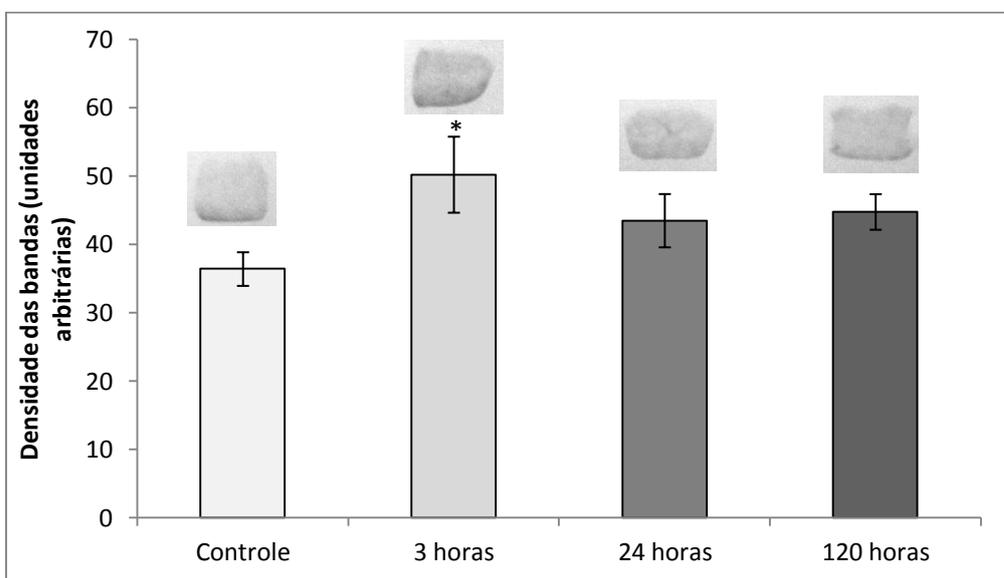
### 3.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi determinada através do test-t de student, sempre com limite de significância em 0,05. O programa utilizado é o Programa Sigma Stat, versão 11.0.

#### 4. Resultados

A expressão de HSP70 foi observada no tecido muscular dos exemplares de *M. acanthurus* submetidos à temperatura de 30° C durante os períodos de 3, 24 horas e 120 horas, havendo diferença somente entre o grupo controle e experimental (3 horas),

No tempo controle (~20° C) a medida da intensidade das bandas foi de  $36,38 \pm 2,46$ . Após o período de exposição a temperatura de ~30° C observou-se um aumento na intensidade das bandas para  $50,19 \pm 5,56$  em 3 horas. Após houve um reestabelecimento dos níveis para  $43,46 \pm 3,9$  em 24 horas e  $44,74 \pm 2,6$  em 120 horas. A intensidade das bandas representa os níveis de HSP70 de cada amostra, e a medida é realizada em unidades arbitrárias (ua).



**Figura 2.** Densidade das bandas de HSP70 expressa no músculo de *Macrobrachium acanthurus* em condição controle (20° C) e após 3, 24, 120 horas de exposição a estresse térmico (30° C). Estão representados os valores da média da densidade das bandas em unidades arbitrárias  $\pm$  erro padrão da média (n=4-5). Acima de cada barra gráfica estão representadas as bandas dos resultados do *western blotting*. O (\*) representa o grupo que diferiu significativamente do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

## 5. Discussão

De acordo com os resultados encontrados, *M. acanthurus* respondeu ao aumento de temperatura de 20°C para 30°C nas três primeiras horas de exposição, aumentando os níveis de expressão das proteínas HSP70. Porém, após 24 e 120 horas de exposição ao aumento de temperatura, os níveis de HSP70 retornam a valores próximos ao encontrado no grupo mantido a temperatura de aclimação 20°C (controle).

No ambiente natural os animais podem estar expostos a mudanças de temperatura, sejam mudanças diárias ou mudanças sazonais. Para lidar com essas variações em que as condições fisiológicas podem ser prejudicadas com o aumento da temperatura, ocorrem uma série de alterações como por exemplo, limitações cardíacas, alterações metabólicas, além de alterações na expressão gênica (Willmer, 2005, Somero, 2010). A capacidade das espécies lidarem com as mudanças está associada à capacidade relativa em modificar os processos de transcrição em resposta ao estresse térmico, como por exemplo, dos genes das proteínas de choque térmico (Somero, 2010).

Assim como em *M. acanthurus*, na espécie *Palaemonetes varians*, o tempo necessário para desencadear uma resposta a nível transcricional devido ao aumento de temperatura foi de poucas horas. Utilizando-se a técnica de PCR em tempo real, em *P. varians*, foi observado que camarões aclimatados a 20°C começaram a apresentar uma significativa síntese de RNAm de HSP70 com aumento para 31°C após 1 hora (Ravaux *et al.*, 2012). Copépodes da espécie *Tigriopus japonicus* também apresentaram esse padrão de expressão de RNAm para HSP70. Foram aclimatados a 20°C e posteriormente submetidos a choque térmico de 30°C, apresentando aumento nos níveis de RNAm para HSP70 em todos os tempos (0, 20, 30, 60, 90, 120 e 180 min) quando comparado ao controle, porém em 90 min houve um pico de expressão. Em 120 e 180 min os níveis de expressão apresentaram declínio (Rhee *et al.*, 2009). O que confirma que após 3 horas durante choque térmico é possível ter um aumento significativo nos níveis de HSP70 já traduzidas a partir do aumento da transcrição de RNAm para essa proteína.

Apesar do aumento da expressão da proteína nas primeiras horas, não houve um aumento em 24 e 120 horas, e os níveis de HSP70 avaliados retornaram a valores próximos ao controle após exposição a elevação de temperatura de longo prazo. Nesse caso, os mecanismos de ajustes termicamente sensíveis da expressão gênica de HSPs devem ser compatíveis com a necessidade dessas chaperonas moleculares pela célula, conforme ocorrem desnaturação e instabilidade das proteínas diante do aumento da

temperatura. Segundo Feder et al., 1992, o excesso de expressão de HSPs pode ser desfavorável ao bom funcionamento da célula. Esse mecanismo de plasticidade e ajuste celular em resposta ao choque térmico tem sido relacionado com a ativação de um fator de controle transcricional citoplasmático, HSF-1 (Buckley e Hofmann, 2002, 2004). Estudos que avaliam a ligação do fator HSF-1 ao elemento de choque térmico HSE no peixe estuarino eurihalino *Gillichthys mirabilis*, indicam que essa alça regulatória ou o “termostato” é capaz de responder a necessidade de síntese de chaperonas, a qual varia de acordo com os níveis de proteínas termicamente desnaturadas ou instáveis nas células de animais euritérmicos, via sensibilidade térmica do fator de controle transcricional HSF-1. Portanto a habilidade de controlar a síntese de HSP em resposta a taxas de degradação de proteínas pode estar também relacionada à euritermia celular (Hofmann, 2005).

Estudos que avaliam a amplitude da tolerância térmica em *M. acanthurus* indicam que a espécie tem a capacidade de se aclimatar a diferentes regimes térmicos e que a sua preferência térmica varia. A espécie apresenta grau intermediário de euritermia e assim, consegue manter a homeostase em uma ampla gama da temperatura ambiental (Díaz et al., 2002). Muitos estudos mostraram que a temperatura limiar de indução de HSP70 não é fixa para uma determinada espécie, e varia com a temperatura de aclimatação ou aclimatização (revisado em Hofmann, 2005; Ravaux et al., 2012). Foi demonstrado que a temperatura crítica mínima e máxima (temperatura letal para todos os indivíduos na condição) pode variar de acordo com a alteração da temperatura de aclimatação. Em *M. acanthurus* aclimatados a temperatura de 20°C, 23°C, 26°C, 29°C e 32°C, a temperatura máxima encontrada foi de 34,2°C, 35°C, 36,1°C e 39,8°C (Díaz et al., 2002). Esses resultados indicam que, assim como em *P. varians*, a mesma espécie ocupando ambientes com temperaturas diferentes, apresenta semelhante capacidade de aclimatação, sendo assim, poderiam facilmente estender sua tolerância térmica quando a temperatura do ambiente sofre aumento (Ravaux, 2012). Assim, com o demonstrado aumento dos níveis de HSP70 diante condições de choque térmico, esses mecanismos de transcrição e padrões de ativação e desativação gênica podem ser eficazes e permitem que a espécie enfrente desafios térmicos sem grandes prejuízos.

Além das características espécie-específicas, que envolve a capacidade dos animais em suportar aumento de temperatura, o tipo de ambiente em que determinada espécie vive e a quanto tempo evoluíram de acordo com essas condições são importantes durante uma resposta ao choque térmico. De acordo com Johnson e Kelsch (1998), espécies de

clima temperado que são expostas a mudanças graduais de temperatura a longo prazo teriam o tempo necessário para fazer mudanças metabólicas que poderiam resultar em mudanças substanciais no seu grau de tolerância. A comparação entre ambientes marinhos com padrões térmicos diferentes, mostra que as diferenças na ativação da resposta ao choque térmico por organismos em seus nichos térmicos varia entre ambientes mais estáveis térmicamente, altamente ou moderadamente variável (revisado em Tomanek, 2010). Animais que evoluíram em ambientes termicamente estáveis podem não ter a opção de induzir a síntese de HSPs, já espécies de ambientes altamente variáveis vivem próximos aos seus limites térmicos maximizam os mecanismos de síntese de HSPs e qualquer variação acima do que estão acostumados encontrar pode limitar a sobrevivência. Os organismos de ambientes moderadamente variáveis teriam a opção de induzir a resposta em uma ampla gama de temperatura acima do que estão acostumados a sofrer.

Variações evolutivas que envolvem complexas características moleculares adquiridas ao longo dos anos, permitem que espécies com comportamento de habitats com temperaturas moderadamente variáveis sofreria menor efeito do aquecimento global do que espécies de ambientes muito estáveis ou altamente variáveis (Tomanek, 2010). Assim, espécies como *Macrobrachium acanthurus* teriam grandes chances de sobrevivência em um mundo com intensa mudança térmica.

## 6. Conclusão

A espécie *Macrobrachium acanthurus* apresenta mecanismos fisiológicos que são ativados durante condições de estresse térmico. Frente ao aumento de temperatura em um curto período de tempo (3 horas de exposição), os mecanismos de resposta ao choque térmico foram verificados através de um aumento dos níveis de expressão da proteína de estresse térmico HSP70. *M. acanthurus* apresenta características de ambientes moderadamente variáveis e em condições de mudanças climáticas os efeitos do aumento de temperatura seriam menos nocivos a espécie, já que possui mecanismos eficientes, como a resposta ao choque térmico e aumento da síntese de HSP70, para manter a homeostase diante desafios térmicos.

## 7. Referências Bibliográficas

- Angilletta, M J (2009). Thermal adaptation: A theoretical and empirical synthesis. Oxford: Oxford University Press.
- Bates, B C; Kundzewicz, Z W; Wu, S and Palutikof, J P (2008). Climate change and water Technical Paper VI of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Geneva: IPCC Secretariat) 210 pp.
- Begon, M; Townsend, C R e Harper, J L (2007). Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas. 4ªed, Artmed, Porto Alegre.
- Bradford, M M (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248–254.
- Buckley, B A and Hofmann, G E (2002). Thermal acclimation changes DNA-binding activity of heat shock factor 1 (HSF1) in the goby, *Gillichthys mirabilis*: Implications for plasticity in the heat shock response in natural populations. J. Exp. Biol. 205:3231–3240.
- Buckley, B A and Hofmann, G E (2004). Seasonal patterns and *in vitro* kinetics of HSF1 activation and Hsp70 mRNA production in the goby, *Gillichthys mirabilis*. Physiol. Biochem. Zool. 77:570–581.
- Choudhury, P C (1970). Complete larval development of the Palaemonidae shrimp *Macrobrachium acanthurus* (WIEGMANN 1836) reared in the laboratory – *Crustaceana* 18(2):113 – 132.
- Díaz, F; Sierra, E; Re, A D and Rodríguez, L (2002). Behavioural thermoregulation and critical thermal limits of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegman). J of Therm Bio 27:423-428.
- Feder, J H; Rossi, J M; Solomon, J; Solomon, N and Lindquist, S (1992). The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. Genes Dev. 6:1402–1413.
- Feder, E M; Parsell, A D and Lindquist, S (1995). The stress response and stress proteins. In: *Cell Biology of Trauma* (ed. J. J. Lemasters and C. Oliver), pp. 177-191. CRC Press. Boca Raton. 65
- Feder, E M and Hofmann, G E (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Physiol. V. 61, p. 243-282.

- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2007). Climate change 2007: the scientific basis. Cambridge University Press, Oxford, UK.
- Johnson, J A and Kelsch, S W (1998). Effects of evolutionary thermal environment on temperature-preference relationships in fishes. *Environ. Biol. Fish.* 53, 447–458.
- Jonsson, H; Schiedek, D and Goksoyr, A (2006). Expression of cytoskeletal proteins, cross-reacting with anti-CYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants, *Aquatic Toxicology* 78S, pp. S42–S48.
- Le Treut, H; Somerville, R; Cubasch, U; Ding, Y; Mauritzen, C; Mokssit, A; Peterson, T and Prather, M (2007). Historical Overview of Climate Change. In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Solomon, S; Qin, D; táManning, M; Chen, Z ; Marquis, M ; Averyt, KB; Tignor, M and Miller, HL (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Lindquist, S and Craig, E A (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-77.
- New, M B (1995). Status of freshwater farming a review. *Aquaculture research* 26: 1-54.
- Patruno, M; Thorndyke, M C; Carnevali, M D C; Bonasoro, F and Beesley, P. W (2001). Growth factor, heat-shock proteins and regeneration in echinoderms. *J. Exp. Biol.* v.204, p.843-48.
- Quadros, M (2002). Estudo da biologia reprodutiva do camarão canela *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) no estuário do Rio Caeté, Bragança-PA. ECOLAB, Belém.
- Ravaux, J; Nelly, L; Rabet, N; Morini, M; Zbinden, M; Thatje, S and Shillito, B (2012). Adaptation to thermally variable environments: capacity for acclimation of thermal limit and heat shock response in the shrimp *Palaemonetes varians*. *J Exp Biol* DOI 10.1007/s00360-012-0666-7.
- Rhee, J S; Raisuddin, S; Lee, K W; Seo, J S; Ki, J S; Kim, I C; Park, H G and Lee, J S (2009). Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicas* to environmental toxicants *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 149(1):104-12.
- Rodriguez, G (1981). Decapoda. In Hurlbert, S.H.; Rodriguez, G. & Santos, N. D. San Diego State University, San Diego. p. 41-51.

- Ruppert, E E; Fox, R S and Barnes, R D; (2005). Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva. 7 ed. São Paulo: Roca.
- Schmidt-Nielsen, K (2002). Fisiologia Animal: adaptação e meio ambiente. 5.ed. São Paulo: Santos.
- Somero, G N (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. J Exp Biol 213:912–920.
- Suguio, K (2008). *Mudanças Ambientais da Terra*. São Paulo: Inst. Geológico. 336 p.
- Tomanek, L (2008). The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. Physiological and Biochemical Zoology, 81, 709–717.
- Tomanek, L (2010) Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. J Exp Biol 213:971–979
- Willmer, P, Stone, G and Johnston, I (2005). Environmental physiology of animals. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 p.
- Yenari, M A; Giffard, G R G; Sapolsky, R M and Steinberg, G K (1999). The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). Mol. Med. Today. V. 5, p.525-531.