

La vita terrestre

Effetti delle basse temperature su cellule e organismi

2 strategie per affrontare il problema del potenziale congelamento dell'acqua:

- 1. Tolleranza al congelamento:** fanno fronte a fenomeni intensi di congelamento con formazione di ghiaccio all'interno delle strutture corporee
- 2. Intolleranza al congelamento:** sono in grado di sopravvivere a T di $-40/-50$ °C senza che si formi ghiaccio, ma vanno incontro a morte rapida se inizia a formarsi qualche cristallo di ghiaccio (**evitano il congelamento**)

Animali tolleranti al congelamento

- **Agenti di nucleazione del ghiaccio:** inducono la formazione di ghiaccio nei fluidi extracellulari
- Negli invertebrati sono proteine la cui struttura presenta molti siti idrofilici che organizzano le molecole d'acqua in piccoli cristalli, riducendo l'energia di attivazione del processo di nucleazione
- Permettono la formazione di ghiaccio in modo lento e controllato
- I soluti si concentrano all'interno delle cellule il tempo necessario per andare incontro a un restringimento controllato
- Tessuti sottoposti a una forte distorsione da parte del ghiaccio circostante

- Sopravvivenza all'inverno a T sotto zero dipende dalla tolleranza al congelamento (poco costosa), la capacità di indurre la conversione di ~ 65% della totale H₂O corporea in ghiaccio extracellulare e sopravvivere per giorni o settimane senza movimento, respiro e circolazione del sangue
- Ben sviluppata in molte specie di insetti, vari invertebrati terrestri e marini interditali e anfibi e rettili terrestri ibernanti
- Uno dei + importanti adattamenti biochimici è l'uso di soluti organici a basso PM

- La scelta di congelare piuttosto che sovraraffreddare si è persa nella storia evolutiva di ogni specie
- Per sopravvivere al congelamento adattamenti biochimici specifici che soddisfano condizioni fondamentali:
 1. Formazione ghiaccio controllata, inizia nei liquidi extracellulari, specifici agenti di nucleazione (proteine specifiche del sangue, dette proteine di nucleazione del ghiaccio, sintetizzate durante i mesi autunnali). Controllo produzione dovuto a stimoli fotoperiodici e ormonali. Meccanismo che controlla la dimensione dei cristalli di ghiaccio: proteine antigelo

2. Salvaguardia struttura e funzione cellulare. Fase liquida extracellulare residua diviene sempre + []  stress osmotico  fuoriuscita H₂O e ingresso soluti. Processo si arresta quando [soluti] è alta da impedire ulteriore trasformazione di H₂O in ghiaccio.

Crioprotettori

di membrana

interagiscono con fosfolipidi.
Cost spessore doppio strato e
stabilizzazione struttura
membrana
Trealosio e pro

colligativi

limitano mediante azione
osmotica, formazione
ghiaccio e perdita H₂O
Poliidrossialcoli usati come
antigelo, glicerolo e sorbitolo,
all'inizio primavera si
ritrasformano in zuccheri.

Enzimi chiave si attivano a basse T

2 tipi:

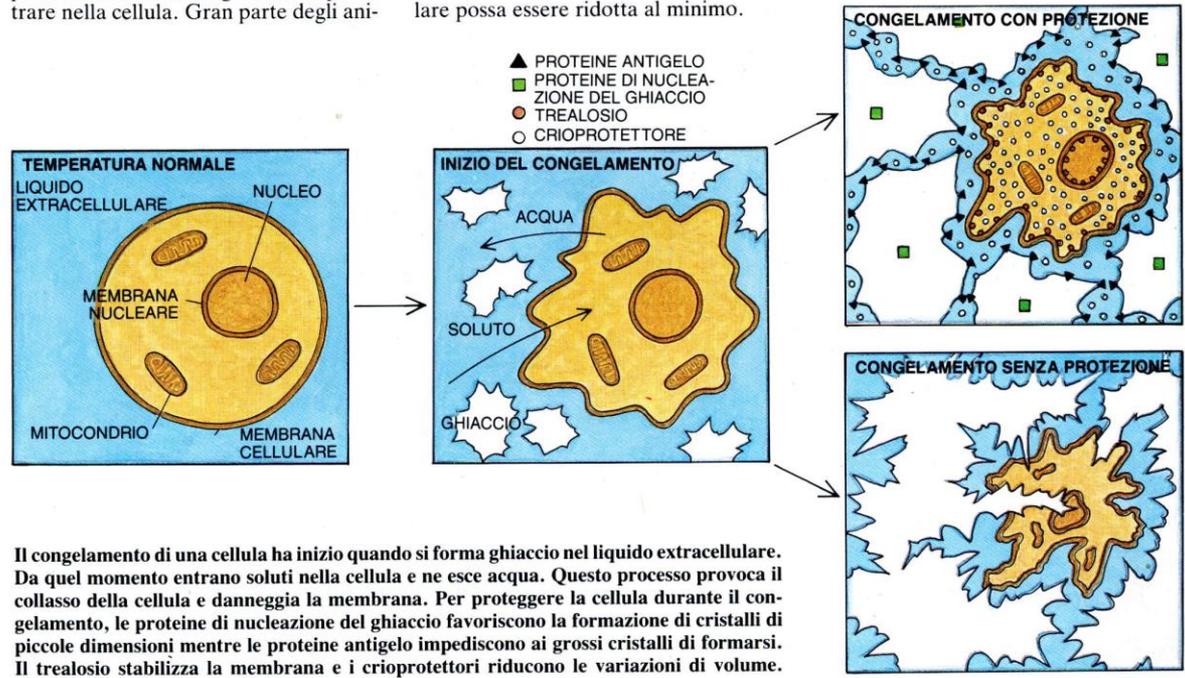
1. Crioprotettivi colligativi sono accumulati ad alte $[\]$ (0.2-2 M) e la loro azione nell'innalzare l'osmolarità dei fluidi corporei riduce la % dell' H_2O totale corporea che può accumulare come ghiaccio extracellulare e previene che il volume intracellulare cada sotto un min critico
2. Accumulati in quantità $<$ ($<$ 0.2 M) hanno specifica funzione stabilizzante la struttura del doppio strato della membrana per prevenire una transizione irreversibile allo stato di gel quando la membrana plasmatica è compressa durante la riduzione di volume cellulare. Trealosio e pro, interagiscono direttamente con le teste polari dei lipidi di membrana per stabilizzare la struttura del doppio strato

Entrambi sono elevati negli insetti tolleranti al congelamento durante l'inverno, e la pro è uno dei $>$ a.a. liberi negli invertebrati marini eurialini e uno la cui $[\]$ può essere cambiata rapidamente in risposta a stress osmotico

- I crioprotettivi naturali colligativi che si accumulano negli animali terrestri sono quasi esclusivamente carboidrati che sono sintetizzati da grandi riserve di glicogeno (nel tessuto adiposo degli insetti, nel fegato delle rane) durante fine estate e primo autunno
- Tra gli insetti il glicerolo
- Altri alcoli in qualche specie: (sorbitolo, ribitolo, eritritolo, treitololo, glicol etilene) e disaccaridi (trealosio e saccarosio)
- Varie specie accumulano 2 o + crioprotettivi; glicerolo e sorbitolo coppia comune

Glicerolo, sorbitolo e composti affini costituiscono eccellenti crioprotettori che non solo forniscono i meccanismi osmotici necessari a regolare il volume cellulare, ma restano atossici per le cellule perfino a [] molto alte. Non cristallizzano spontaneamente da soluzioni acquose a bassa T e passano liberamente attraverso le membrane

trare nella cellula. Gran parte degli ani- lare possa essere ridotta al minimo.



. Questi poliidrossialcoli rendono stabile la struttura delle proteine e degli enzimi e li proteggono dagli effetti denaturanti delle basse T o del congelamento

Soluti organici nella tolleranza al congelamento

- Ogni soluto ha un certo effetto anticongelante
- L'accumulo di alti livelli di soluti a basso PM (alcoli polidrici, saccarosio) provvede alla crioprotezione agli animali tolleranti al congelamento per minimizzare, via effetti colligativi, la % di H₂O corporea convertita a ghiaccio extracellulare e il grado di riduzione del volume cellulare
- Insetti: accumulano alti livelli di polioli durante l'autunno
- Rane: rispondono alla formazione di ghiaccio nei tessuti periferici per mezzo della sintesi di grandi quantità di glu nel fegato e rapidamente distribuite nel corpo
- Le attività enzimatiche associate con la sintesi dei crioprotettivi aumentano in autunno, mentre gli enzimi associati con la degradazione dei polioli dominano in primavera
- Durante lo scongelamento, organi quali fegato e cuore si scongelano prima, permettendo il recupero delle loro funzioni vitali per iniziare mentre il resto della rana è congelato.
- Ruolo chiave dei recettori β adrenergici

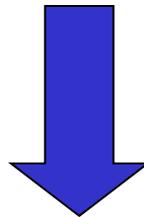
Perché il glicerolo?

- Alta solubilità, non tossico e compatibile con macromolecole biologiche, vie biosintetiche e cataboliche che sono centrali e costitutive, ottima entrata di particelle osmoticamente attive ed ottima efficienza di conversione
- Altre rane usano invece glu
- Insetti accumulano polioli a lungo termine (giorni/settimane)
- Rane producono glu solo come risposta immediata all'iniziazione della formazione di ghiaccio nelle estremità corporee
- La via biosintetica per il glu nel fegato è corta, coinvolge enzimi ad alta attività, è ATP-indipendente (importante come si sviluppa l'ischemia durante il congelamento), può essere attivata sotto controllo catecolammine e i trasportatori di membrana del glu sono costitutivi in tutti gli organi dei vertebrati e possono essere modificati per accomodare alti tassi di trasporto del glu

Metabolismo crioprotettivo negli insetti

- Sintesi crioprotettivi facilitata con precedente accumulo glicogeno nel tessuto adiposo ed aumento attività degli enzimi richiesti
- Correlato con diapausa, soppressione coordinata delle attività degli enzimi chiave associati con metabolismo ossidativo dei mitocondri nei mesi invernali: attività di citrato sintasi, NAD-isocitrato deidrogenasi e glutamato deidrogenasi tutte ridotte di ~ 50%
- Soppressione metabolismo ossidativo che è una caratteristica generale della dormienza

- Il relativo flusso dei carboidrati attraverso il ciclo dei pentoso fosfati, paragonato con la glicolisi, ↑ durante la sintesi di polioli indotta dal freddo.
- Attività gliceraldeide chinasi ATP-dipendente e sorbitolo deidrogenasi appaiono a fine inverno



Le vie di degradazione per entrambi i polioli messe in opera simultaneamente come si avvicina la primavera

Tutte le attività di glicogeno fosforilasi, glu-6-fosfatasi, e polioli deidrogenasi (misurata con il glu come substrato) ↑ insieme durante l'autunno e poi cessano nei mesi invernali, mentre le attività di sorbitolo deidrogenasi ed esochinasi/glucochinasi molto basse in autunno, un picco a fine inverno quando il sorbitolo è catalizzato e poi crollano di nuovo a fine primavera

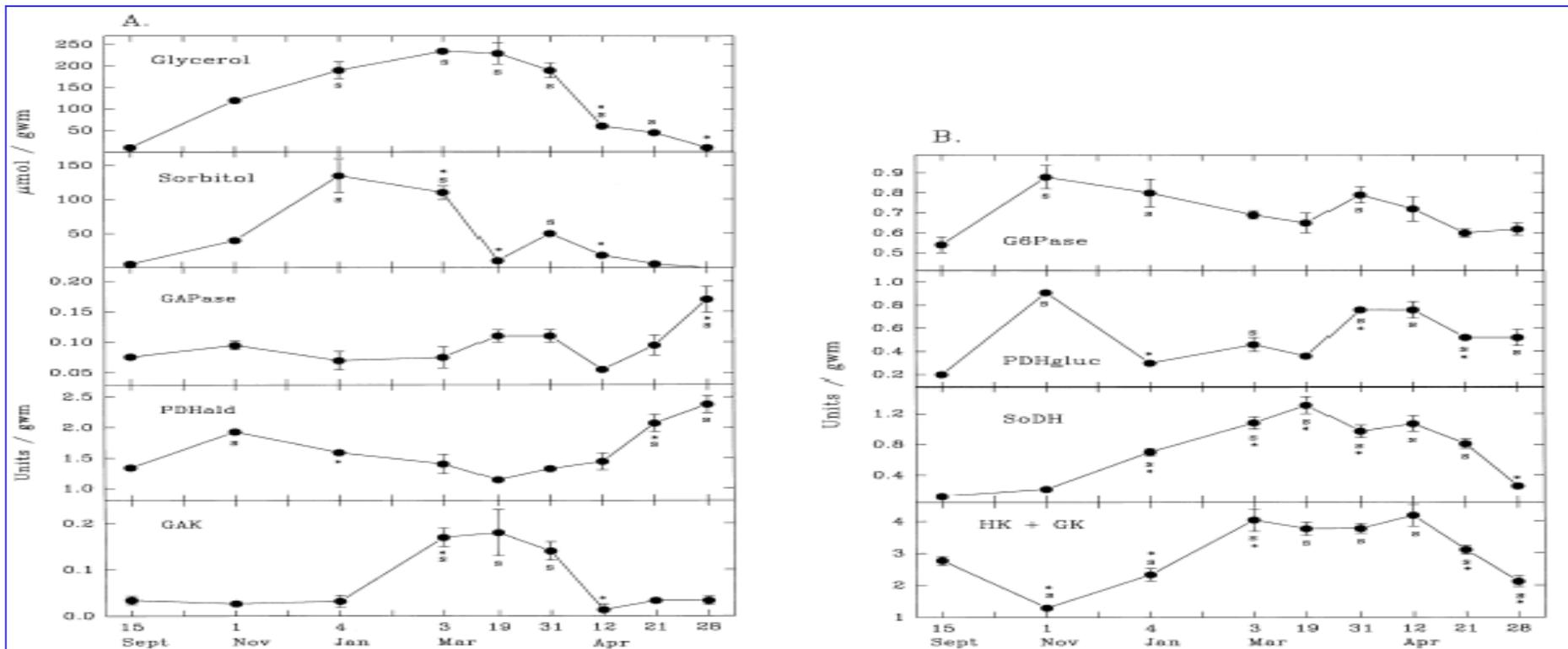
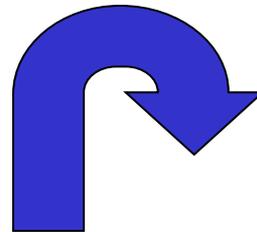


FIG. 1. Seasonal changes in the levels of cryoprotectants (glycerol and sorbitol) and in the activities of enzymes associated with their synthesis and catabolism in larvae of the freeze tolerant gall fly *Eurosta solidaginis*. Data are mean \pm SEM, $n = 4-6$ with polyol concentrations in $\mu\text{mol/g}$ wet mass and enzyme activities in μmol substrate utilized/ min/g wet mass at 25°C . Abbreviations: GAPase, glyceraldehyde-3-phosphatase; PDHald, polyol dehydrogenase using glyceraldehyde as the substrate; GAK, glyceraldehyde kinase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; PDHgluc, polyol dehydrogenase using glucose as the substrate; SoDH, sorbitol dehydrogenase; HK + GK, hexokinase + glucokinase. Data were analyzed with a one-way ANOVA followed by the Student-Neuman-Keuls test. s, Significantly different from the September value, $P < 0.05$; * significantly different from the value for the previous sampling date, $P < 0.05$. Modified from Joannis and Storey (15).

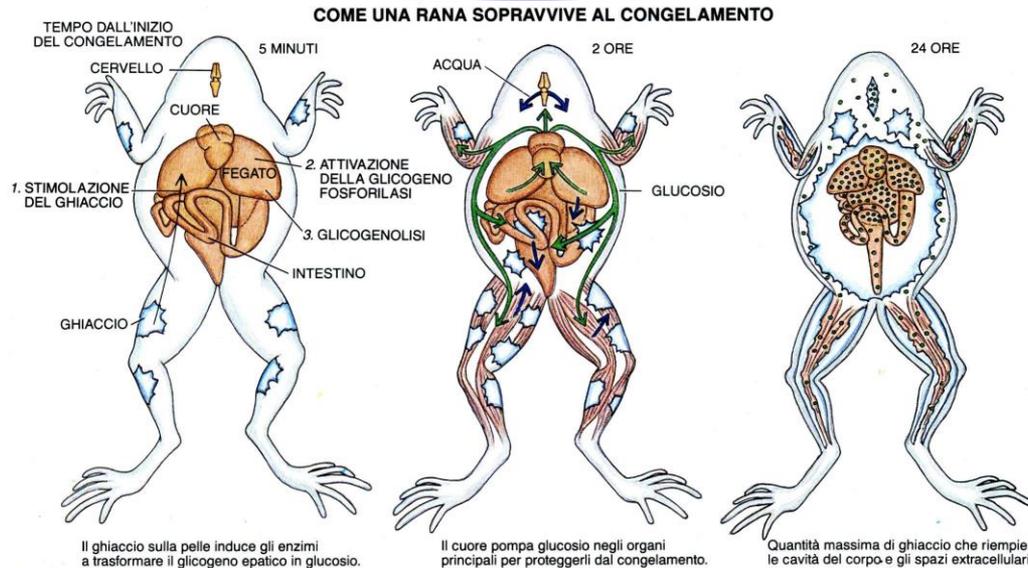
Metabolismo crioprotettivo nei vertebrati

- La produzione dei crioprotettivi in tutti gli animali è soppressa per mezzo di iniezioni del bloccante propranolo β -adrenergico, i recettori β_2 -adrenergici dominano (opposti ai recettori α -adrenergici) nelle membrane plasmatiche epatiche durante le prime ore di esposizione al congelamento
- Il glu, al contrario del glicerolo e del dimetilsulfossido, è considerato un crioprotettivo povero perché non può entrare rapidamente nelle cellule
- Si può ipotizzare che nelle specie tolleranti il congelamento le acquaporine siano in n° elevato per facilitare il movimento dell'H₂O durante il congelamento e lo scongelamento
- Molte cellule dei mammiferi sono impermeabili al sorbitolo, che è uno dei > poliloli accumulati dagli insetti tolleranti al congelamento



Presenza di un trasportatore per il sorbitolo negli insetti

Alti livelli di glu possono arrecare danni, perché le rane lo usano? Il glu può essere prodotto rapidamente da glicogeno epatico. La sintesi dei crioprotettori nelle rane è un'esasperazione della risposta "combatti e fuggi", mediata dall'adrenalina e fa ↑ il tasso di glu nel sangue in caso di stress



Lo zucchero ha specifici effetti benefici sulla crioconservazione degli organi dei vertebrati. Glu e glicerolo producono gli stessi effetti osmotici necessari al controllo della riduzione del volume cellulare durante il congelamento

La capacità di ridurre il tasso metabolico fino all'1-10% del valore normale a riposo, è una strategia adattativa utilizzata da molti animali per sopravvivere a condizioni ambientali estreme. Un ↓ di un fattore 10 del tasso metabolico ↑ di 10 volte il tempo di sopravvivenza con una determinata riserva di combustibile corporeo



La raganella grigia (*a sinistra*) congela sotto la coltre di neve, dove la temperatura scende a -8 gradi Celsius. Il congelamento rende blu i suoi pigmenti cutanei (*a destra*).

Esempio: letargo mammiferi, possono risparmiare fino all'88% dell'energia che altrimenti spenderebbero per la sopravvivenza durante l'inverno. Numerosi insetti in diapausa (stato di arresto dello sviluppo), tartarughe svernano sul fondo dei bacini acquatici abbassando il loro tasso metabolico e superare l'inverno senza respirare