

# Resposta celular ao estresse

T. N. MEYER, A. L. DA SILVA

Trabalho realizado no Curso de Pós-graduação em Cirurgia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

UNITERMOS: Resposta ao estresse. Resposta ao choque térmico. Proteínas do estresse. Proteínas do choque térmico. Chaperonas. Resposta da fase aguda.

KEY WORDS: Stress response. Heat-shock response. Stress proteins. Heat-shock proteins. Chaperones. Acute-phase response.

## INTRODUÇÃO

*“Das moscas de frutas às doenças autoimunes e ao câncer, as proteínas chaperonas são as moléculas maravilhosas cativando a imaginação de pesquisadores em toda a comunidade científica. Muitas novas avenidas serão abertas através do estudo e do entendimento da resposta celular ao estresse. Estamos apenas começando a portentosa aventura que aguarda nosso descobrimento de como as células lidam com o estresse.”* (Wynn *et al*, 1994<sup>1</sup>).

Nos últimos dez anos, mais de 10.000 trabalhos científicos foram publicados a respeito das HSP (Heat Shock Proteins), ou proteínas do choque térmico, e da resposta ao choque térmico, ou HSR (Heat Shock Response). Muitos outros vieram à luz focalizando outras respostas celulares ao estresse. O conhecimento destes fenômenos básicos é indispensável à compreensão de inúmeras condições patológicas. As aplicações clínicas são potencialmente muito vastas e podem vir a ser fundamentais em diversas doenças, hoje de difícil abordagem, como a síndrome de resposta inflamatória sistêmica, o câncer, as doenças infecciosas e outras. Múltiplas pesquisas estão em andamento, há ainda muito o que se descobrir, mas a relevância do assunto justifica plenamente o seu estudo e a sua divulgação.

### **Resposta ao choque térmico (HSR - Heat Shock Response)**

Em 1962, descobriu-se que a exposição de células de glândulas salivares de *Drosophila busckii* a calor, dinitrofenol ou salicilatos<sup>2</sup> produzia o surgimento, em cromossomos, de um novo padrão de espessamento, que representava sítios específicos de transcrição para a síntese de proteínas. O

estresse térmico ou químico induzia a expressão de genes, até então quiescentes, os quais faziam com que as células estressadas fabricassem grande quantidade de uma determinada classe de proteínas, que foram chamadas de Heat Shock Proteins (HSP), ou proteínas do choque térmico. O processo pelo qual as células respondiam ao estresse ficou conhecido como Heat Shock Response (HSR), ou resposta ao choque térmico.

Verificou-se, posteriormente, que a HSR era um fenômeno praticamente universal entre todos os seres vivos<sup>3</sup>. Esta resposta é caracterizada por um aumento extremamente rápido na expressão de um grupo seletivo de proteínas, as HSP, o que não ocorre apenas após exposição ao calor, mas também quando as células são expostas a diversos outros desafios metabólicos, incluindo análogos de aminoácidos, diversos metais pesados, agentes que modificam as sulfidrilas protéicas, diversos ionóforos e outros venenos metabólicos<sup>4</sup>. Os agentes anti-reumáticos à base de sais de ouro, como auro-tiomalato de sódio e auranofim, foram capazes de induzir a expressão de HSP em macrófagos murinos cultivados<sup>5</sup>.

As HSP são uma classe de proteínas altamente conservadas, desde seres primitivos (procariontes) até o homem, o que é um indício de seu grande valor evolutivo<sup>6</sup>. As HSP podem ser agrupadas em famílias: HSP-27, HSP-47, HSP-60, HSP-70, HSP-90 e HSP-110<sup>3</sup>, de acordo com suas seqüências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (em kD - quilodaltons), determinados pelo método SDS-PAGE (eletroforese em gel de poli(acrilamida-sódio-dodecil-sulfato))<sup>7</sup>. Em cada família, há diferentes proteínas - por exemplo, HSP-72 e HSP-73 no grupo HSP-70; os pesos moleculares são similares, mas os padrões de indução e expressão são distintos. A família HSP-70 é a mais conservada filogeneticamente; sua estrutura, no homem, é 72% homóloga em relação às HSP-70 de drosófilas<sup>8</sup>. As famílias HSP-60 e HSP-70 são as mais ligadas ao processo geral de dobramento de proteínas nas células<sup>1</sup>.

Diversos tipos de estresse metabólico (exposição ao calor, metais pesados, diversos ionóforos, análogos de aminoácidos e venenos metabólicos que

afetam a produção de ATP), resultam em alterações similares na expressão de genes, levando ao acúmulo de HSP. Muitos destes agentes estressantes indutores compartilham a propriedade comum de serem “caotroproteicos” - afetam, de modo adverso, a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas<sup>9</sup>. Nas condições em que proteínas incorretamente dobradas se acumulam nas células, começa uma resposta ao estresse, ou HSR. Esta se inicia pela ativação de um fator específico de transcrição, chamado HSF-1 (Heat Shock Factor, ou fator do choque térmico). Tal fator estaria presente na célula normal e não-estressada como um monômero inativo. Em resposta ao estresse metabólico, rapidamente sofreria trimerização, o que tornaria possível sua ligação imediata a uma seqüência de nucleotídeos, chamada de HSE (Heat Shock Element, ou elemento do choque térmico), localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as HSP, tudo resultando em alto nível de transcrição dos genes do choque térmico. Em condições experimentais, demonstrou-se que o tratamento prévio com indometacina potencia a atividade de ligação ao DNA do HSF-1 - isto é, o pré-tratamento com esta substância abaixa o limiar de temperatura da ativação do HSF-1, em culturas celulares<sup>10</sup>. Juri-vich *et al.*<sup>11</sup> demonstraram, em células HeLa S3 humanas, que os salicilatos podem induzir parcialmente a resposta ao choque térmico, sem contudo haver elevação da expressão dos genes do choque térmico.

Células submetidas a estresse podem sobreviver ou morrer, na dependência do tipo celular, tipo e intensidade do estresse e de outros fatores. A exposição prévia das células a estresses não-mortais pode suscitar a HSR, com a síntese de HSP. Uma nova exposição das células a estresses vai produzir menos lesões. As células que sintetizaram as HSP ficam protegidas contra novas exposições, o que se reflete em menores lesões também no organismo ou em partes dele.

As HSP não são induzidas apenas em condições de estresse. Há componentes desta classe protéica, conhecidas como HSC (Heat Shock Cognates)<sup>12</sup>, que são expressos constitutivamente, isto é, dentro da vida normal dos organismos não submetidos à condições de estresse<sup>7</sup>. As formas cognatas não são idênticas às formas indutíveis; estas, quando surgem, somam quantidades muito maiores do que aquelas constitutivas. Na família HSP70, a forma indutível HSP72 é a mais conhecida e estudada e existe no interior do núcleo e no citoplasma.

O principal mecanismo de ação das HSP, mediante o qual conferem proteção, seria o de atuarem

como “chaperonas” moleculares<sup>12</sup>. Chaperona, inexistente em português, serve para designar substâncias que, sem fazer parte da estrutura final de proteínas, evitam interações incorretas entre estas, auxiliam na montagem final das mesmas<sup>13</sup>, bem como em sua síntese, dobramento e degradação. O dobramento de proteínas é um processo muito importante em biologia, pois converte cadeias lineares de polipeptídeos em estruturas tridimensionais, as quais possibilitam que as proteínas exerçam todas as suas atividades vitais<sup>14</sup>. As proteínas funcionais intracelulares estão normalmente presentes em suas formas nativas, completamente dobradas. Entretanto, processos vitais da biogênese protéica, tais como a sua síntese e transmigração (translocation, em inglês) para os compartimentos intracelulares, requerem que a proteína exista, temporariamente, em conformação desdobrada ou parcialmente dobrada. Regiões ocultas quando um polipeptídeo está em sua conformação nativa tornam-se expostas e interagem com outras proteínas, causando agregação nociva para a célula.

Em condições normais, os polipeptídeos corretamente dobrados têm as porções hidrofóbicas de seus aminoácidos voltadas para o interior da molécula, ao passo que os componentes hidrofílicos voltam-se para o exterior. Isto possibilita solubilidade em meio aquoso e impede agregação, que de outro modo ocorreria pela interação das áreas hidrofóbicas com aquelas de outras moléculas. Se a proteína estivesse desdobrada (o que ocorre em determinadas fases de sua síntese e transporte entre organelas), agregações indevidas poderiam existir, levando à perda destes polipeptídeos. As HSP atuam evitando tais interações aleatórias - como “protetoras moleculares”, ou “chaperonas” - até que o término do processo de dobramento ocorra e a proteína adquira resistência<sup>1</sup>. A fim de evitar esta agregação quando as proteínas estão desdobradas, as HSP protegem as superfícies interativas ligando-se a elas e facilitando o dobramento de polipeptídeos nascentes ou desdobrados. Em outros casos, a ligação de HSP a superfícies interativas de proteínas completamente dobradas é parte crucial de sua regulação.

Na medida em que o choque térmico e outras condições estressantes causam um efeito de desdobramento parcial das proteínas celulares, a capacidade das HSP de proteger as células contra os efeitos adversos do estresse torna-se uma extensão lógica de sua função normal como chaperonas<sup>15</sup>. Ademais, as HSP aumentam a rapidez de remoção de proteínas desnaturadas de dentro das células<sup>16</sup>.

Todos os membros da família HSP70 ligam-se a ATP através de um domínio nucleotídico altamen-

te conservado. Os membros desta família ligam-se tanto a proteínas não-dobradas quanto a pequenos polipeptídeos *in vitro*. Em seus compartimentos subcelulares, interagem com outras proteínas submetendo-se à síntese nos ribossomos ou transmigração para outras organelas. Assim, funcionam nos estágios precoces da maturação proteica, ligando-se a elas e estabilizando-as, enquanto não dobradas. Uma vez que a síntese ou a transmigração organelar esteja concluída, a HSP70 é liberada, em processo que requer ATP, permitindo que a nova proteína comece a dobrar-se ou a sofrer montagem<sup>9</sup>. Segundo Wynn *et al.*<sup>1</sup>, o dogma atual seria: a HSP-70 citossólica liga-se à cadeia polipeptídica nascente, enquanto esta ainda está associada ao ribossomo. As proteínas precursoras, que irão dirigir-se às mitocôndrias e ao retículo endoplasmático, ligam-se temporariamente à HSP-70 carreadora no citosol, até que sejam liberadas para outras HSP-70 nas organelas. A cadeia polipeptídica transferida entre proteínas chaperonas durante a importação organelar tem conformação estendida, com pouca estruturação secundária ou terciária. A troca de polipeptídeos, mediada por chaperonas, entre HSP citoplasmáticas e organelares, pode também conferir a força necessária à transmigração do polipeptídeo para o interior da organela. Após esta interação com HSP-70, as proteínas recentemente importadas são transferidas para HSP-60 organelar, dobrando-se em reação dependente de ATP.

Os níveis aumentados de proteínas do estresse dão a célula meios para: a) identificar e talvez facilitar redobramento de proteínas afetadas de modo adverso pelo estresse metabólico; b) identificar e fazer ligação com proteínas anormalmente dobradas, de modo que estas sejam marcadas e enviadas a um sistema proteolítico adequado, assim facilitando a eliminação das proteínas defeituosas; c) facilitar a síntese e a maturação de novas proteínas, que irão substituir aquelas destruídas no estresse metabólico.

A família HSP-90, com função regulatória de enzimas e proteínas de transcrição e muito conservada na escala evolutiva, tem papel distinto daquele das HSP-60 e HSP-70. Poderiam ser apelidadas de “casamenteiras”<sup>1</sup>, aproximando moléculas, auxiliando em sua união e, depois, dissociando-se dos complexos resultantes. A HSR é, na filogênese, a mais antiga forma de resposta ao estresse<sup>17</sup>, sem ser a única. As células e os organismos têm várias formas básicas de responder a estes desafios.

### **Respostas ao estresse oxidativo e ao estresse por ultravioleta**

No nível celular, além da HSR, há mais dois

mecanismos de respostas: ao estresse oxidativo e ao estresse por ultravioleta. Os nomes, assim como aquele da HSR, derivam do estresse típico que suscita a resposta, entretanto, esta pode ser gerada por diferentes tipos de desafios.

A resposta ao estresse oxidativo ocorre quando as células são expostas aos metabólitos reativos de oxigênio, ou ROM (Reactive Oxygen Metabolites). Estas substâncias podem danificar macromoléculas biologicamente ativas e fundamentais, como o DNA e outras proteínas. A célula responde produzindo heme-oxigenase<sup>18</sup>. A exposição à radiação ultravioleta pode, de modo análogo, lesar proteínas. A resposta celular é a indução do gene *gadd153*<sup>19</sup>.

Estes três tipos de resposta ocorrem como resultado de um estresse que gerou efeitos biofísicos em macromoléculas dentro da célula<sup>17</sup>, levando à expressão de genes e à transcrição de produtos protetores (como as HSP ou a heme-oxigenase).

### **Resposta da fase aguda**

Um quarto tipo de resposta aos estresses, a APR (Acute Phase Response, ou resposta da fase aguda), difere das anteriores em alguns aspectos importantes: ocorre em múltiplos tipos celulares, como monócitos, macrófagos, células endoteliais e células epiteliais; não existe em organismos unicelulares; depende de comunicação inter-celular, mediada por citocinas, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 e exige a expressão de múltiplos genes e seus produtos. Nesta resposta, o fígado produz uma série de produtos denominados reagentes da fase aguda: PCR (proteína C-reativa), fibrinogênio, ceruloplasmina, transferrina e  $\alpha_1$ -antitripsina, fundamentais para coagulação, opsonização, inibição de proteases e outros fenômenos defensivos e inflamatórios<sup>20</sup>. O estresse cirúrgico é um exemplo típico de causador da APR<sup>21</sup>. Esta, mais de organismos do que de células, pode contribuir para efeitos nocivos, se exagerada: a SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome, ou síndrome de resposta inflamatória sistêmica) que, se perdura e evolui, causa a MODS (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, ou síndrome de disfunção orgânica múltipla).

### **Interrelações entre as respostas**

Estes tipos básicos de respostas aos estresses estão, sob vários aspectos, superpostos. É que existem relativamente poucos fatores de transcrição ativados por estresse. Um determinado tipo de estresse pode gerar duas ou três modalidades das respostas básicas já mencionadas. A HSR e a APR não compartilham fatores de transcrição nem genes ativadores. Na verdade, os programas genéticos

destas duas respostas são distintos, exclusivos e priorizados e a HSR, que é mais primitiva, precede, reduz ou extingue a APR<sup>22</sup>. Tal assertiva é apoiada pelo fato de que as HSP inibem a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 em monócitos humanos e em macrófagos de ratos ativados por lipopolissacarídeos<sup>23</sup>.

### **HSR: efeitos protetores e papéis fisiopatológicos**

Têm coerência as observações de que as HSP protegem células e tecidos dos efeitos deletérios da inflamação, o que ocorreria através da prevenção da quebra de cadeias de DNA induzida por ROM e peroxidação lipídica, bem como através de proteção da estrutura e função das mitocôndrias. *In vivo*, o choque térmico protege órgãos contra uma série de lesões associadas com produção aumentada de citocinas e/ou de ROM<sup>24</sup>. A superexpressão das HSP-70 pode proteger a célula contra necrose induzida pelos TNF- $\alpha$  e - $\beta$ <sup>25</sup>.

No câncer, as HSP estão envolvidas em vários aspectos: estabilização do mRNA de proto-oncogenes; interação com a proteína p53 mutante; HSP podem ser antígenos tumorais e há chances de que se possam elaborar vacinas com base nessas proteínas<sup>7</sup>. Por outro lado, verificou-se que a expressão aumentada de HSP-27 e HSP-70 está associada com maior sobrevivência de células neoplásicas submetidas a alguns agentes quimioterápicos<sup>9</sup>.

É provável que as HSP-70, em virtude de suas funções como chaperonas, possam ter um papel no processamento e apresentação de antígenos<sup>26</sup>. Os linfócitos B e os monócitos aumentam suas funções de processamento e/ou apresentação de antígenos após choque térmico<sup>12</sup>.

Em roedores, a hipertermia (choque térmico) induziu um aumento no nível de HSP no coração, o que conferiu proteção, uma vez que estes animais, se comparados a controles, sofreram menor lesão miocárdica em resposta a um episódio subsequente de isquemia-reperusão<sup>9</sup>. Isto foi também observado em coelhos<sup>27</sup>. Após uma obstrução coronariana, as células miocárdicas são lesadas pela isquemia e, a seguir, pela reperusão, com sua liberação de ROM. As células com níveis altos de HSP, induzidos previamente, são mais resistentes<sup>28</sup>. Se esta resposta fosse farmacologicamente indutível, isto seria de grande valia no tratamento da isquemia miocárdica. Morris *et al.*<sup>29</sup> demonstraram que a expressão de HSP-70 protege cardiomiócitos de ratos (em cultura) contra isquemia e elevação de temperatura que, de outro modo, seriam letais. A indução das HSP-70 pôde ser feita, em seu modelo, por meio farmacológico (uso da herbimicina-A) e sem gerar a produção de HSP de outras famílias, o que pode vir

a suscitar aplicações clínicas relevantes.

No sistema nervoso central foi também observado efeito benéfico do choque térmico, em ratos, protegendo contra lesão induzida por isquemia/reperusão e por estimulação com glutamato<sup>30</sup>. Na retina, a lesão provocada por exposição à luz intensa foi reduzida, ainda em roedores, pela submissão prévia a choque térmico, o que coincidiu com aumento no nível de HSP-70 na retina<sup>31</sup>.

Zeniya *et al.*<sup>32</sup> demonstraram que, em ratos, o estresse por submersão produziu úlceras no estômago. Estas foram numerosas e importantes no fundo gástrico, ao passo que a região pilórica foi poupada. A expressão de HSP-72 foi maior na mucosa pilórica e precedeu a formação de úlceras gástricas. Deste modo, sugeriram que a HSP-72 tem efeito citoprotetor na mucosa gástrica. Estes resultados coincidem com aqueles de Nakamura *et al.*<sup>33</sup>, que demonstraram, em cultura de células da mucosa gástrica de cobaias, efeito protetor, dado por HSP, contra lesões induzidas por etanol. Otaka *et al.*<sup>34</sup> demonstraram que a indução de HSP protege contra a pancreatite induzida por ceruleína em ratos. Emami *et al.*<sup>35</sup> obtiveram efeitos citoprotetores em rins de ratos pelo estresse térmico.

As HSP de uma série de microrganismos patogênicos podem funcionar como antígenos imunodominantes em animais<sup>9</sup>. Um dos alvos principais da resposta humoral dos mamíferos às infecções bacterianas é justamente uma proteína denominada GroEl - um homólogo bacteriano da HSP-60. Em diversas doenças parasitárias as formas de HSP-70 e HSP-90, produzidas por estes agentes patogênicos, representam o alvo principal da resposta imune do hospedeiro. De acordo com Minowada<sup>9</sup>, os seguintes microrganismos têm as HSP como antígenos imunodominantes: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Legionella pneumophila*, *Treponema pallidum*, *Clamidia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetti*, *Onchocerca volvulus* e *Bruzia malay*. É possível que a resposta imune contra as HSP antigênicas de microrganismos proteja contra infecções, o que pode abrir caminho à fabricação de muitas vacinas<sup>36</sup>.

As HSP teriam papel em diversas doenças autoimunes<sup>37</sup>, mas não foi estabelecida relação causal. No campo da toxicologia, certos poluentes ambientais suscitam a síntese das HSP em células desenvolvidas *in vitro*<sup>38</sup>.

### **Resposta ao trauma e cirurgia**

A cicatrização de feridas pode ter relações próximas com as HSP. Um experimento<sup>39</sup> demons-

trou que a simulação de uma síndrome de Cushing, pela administração de dexametasona em uma câmara de cicatrização implantada em ratos, reduzia acentuadamente os processos cicatriciais e a síntese de HSP-25, HSP-72 e HSP-73.

O estresse cirúrgico - o conjunto de lesões e desafios associados a uma operação, desde o pré até o pós-operatório - produz uma série de respostas adaptativas. Estas envolvem vários eixos homeostáticos, dos quais os mais importantes são: o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenais (HHA), o SNA (sistema nervoso autônomo) e a APR. Os estímulos aferentes, vindos dos tecidos traumatizados e dos baro-receptores, fazem com que o sistema nervoso central ative tanto o eixo HHA quanto o SNA. A lesão dos tecidos resulta na produção de citocinas, que penetram na circulação, interagem com receptores teciduais específicos e suscitam a APR<sup>21</sup>. As HSP têm papel importante nestas respostas fundamentais. A ativação do eixo HHA faz com que o hipotálamo produza CRH (Corticotrophin Releasing Hormone, ou hormônio liberador de corticotrofina). Este induz, na hipófise anterior, a liberação da corticotrofina (ACTH) que, nas adrenais, estimula a produção e a liberação dos glucocorticóides. Estes ligam-se a receptores de glucocorticóides, existentes no citosol, os quais atuam como fatores de transcrição para modular a expressão de genes. Estes receptores, em estado inativo, estão presentes em quase todas as células nucleadas e são mantidos em interação com as HSP. Após a ligação com os hormônios, são transportados até o núcleo celular, desassociam-se das HSP, o que resulta em uma alteração de sua conformação. Deste modo, ligam-se ao DNA em um local específico: o elemento de resposta aos glucocorticóides, localizado na região promotora de genes capazes de responder a estes hormônios. Esta ligação ao DNA modula a taxa de transcrição do mRNA que, por sua vez, afeta os níveis de produtos protéicos codificados. Estas proteínas têm efeitos globais na homeostase, influenciando vias metabólicas, níveis de citocinas e de receptores hormonais, bem como a síntese e a atividade de outros hormônios, inclusive catecolaminas<sup>21</sup>.

Paralelamente, ocorre a APR, reação sistêmica a trauma tecidual localizado, caracterizada por febre, leucocitose, ativação imunitária, estímulo do eixo HHA e alteração nos níveis circulatórios dos reagentes da fase aguda. Os efeitos sistêmicos da APR são mediados pelas citocinas IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , que exercem seus efeitos alterando a expressão de genes. A APR está ligada de perto às respostas endócrinas ao estresse, especialmente à ativação do eixo HHA.

A resposta do SNA centra-se em sua porção simpática. Há síntese e liberação de catecolaminas, as quais se ligam aos receptores adrenérgicos. Estes compreendem um subgrupo de receptores ligados às proteínas-G (proteína ligante à guanina-nucleotídeo), os quais estimulam ou inibem a atividade da adenilato-ciclase ou ativam a fosfolipase-C, resultando na modulação dos níveis de segundos mensageiros: AMP-cíclico (mono-fosfato de adenosina cíclico), trifosfato de inositol ou diacil-glicerol. Estes, por sua vez, afetam a atividade de quinases protéicas, que alteram o estado de fosforilação de proteínas intra-celulares - as efetadoras da resposta ao estresse. Há uma relação íntima entre o aumento da atividade simpática e a ativação do eixo HHA.

Os glucocorticóides, as catecolaminas e as citocinas da APR são capazes de modular a expressão de genes, alterando a taxa pela qual um determinado gene é transcrito em mRNA. As substâncias citadas podem aumentar a expressão dos chamados "fatores de transcrição", que interagem com os elementos cis-regulatórios (seqüências específicas de DNA), presentes nas regiões promotoras dos genes responsivos. Os fatores de transcrição mais importantes nas respostas ao estresse incluem, segundo Udelsman e Holbrook<sup>21</sup>: Complexo Receptor de Glucocorticóides; CREB (proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP-cíclico); NF-IL-6 (fator nuclear da IL-6); NF-kB; AP-1 (proteína ativadora 1) e os HSF (fatores do choque térmico). Todas estas respostas (HHA, SNA, APR) ocorrem, como já foi dito, no organismo todo.

No nível celular, a resposta mais ubíqua ao estresse é a HSR e a expressão das HSP é marcadamente induzida após estresse cirúrgico experimental<sup>40</sup>, ocorrendo seletivamente no córtex adrenal e na parede da aorta e veia cava. Tal indução de HSP parece estar sob controle endócrino (ACTH na adrenal e estimulação de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos nos vasos). Esta resposta está bastante atenuada em células e animais idosos - mais um dado instigante a respeito deste tema de inúmeros dobramentos<sup>41</sup>.

A indução da HSR, como se sabe, produz respostas protetoras celulares e, por extensão, protege também o organismo ou partes dele. Garramone *et al.*<sup>42</sup> demonstraram que a HSR protegia contra lesões produzidas em músculos esqueléticos submetidos a isquemia; nos animais que previamente sofreram o choque térmico, houve indução de HSP-72 no músculo; após a isquemia, houve muito menos lesões do que em outro grupo de animais, não submetidos ao condicionamento térmico prévio. Outro trabalho<sup>43</sup> mostrou que o choque térmico

aumentou o comprimento útil de retalhos cutâneos ao acaso feitos em roedores.

Villar *et al.*<sup>44</sup> desenvolveram um modelo experimental de sepse e lesão pulmonar aguda (SARA, ou síndrome de angústia respiratória do adulto). Os animais foram divididos em grupos. Aqueles previamente condicionados pelo choque térmico apresentaram notável redução da mortalidade em sete dias (21%), quando comparados aos que não foram assim condicionados (69% de mortalidade). Os animais condicionados mostraram menos evidências histológicas de lesões pulmonares e hepáticas. Posteriormente, Ribeiro *et al.*<sup>45</sup> mostraram que um mecanismo possível para esta redução de mortalidade seria a diminuição da produção de TNF- $\alpha$  mediada pela HSR.

É possível que parte do efeito protetor, nos casos de inflamação generalizada (como na SARA), se deve a indução de HSP nas células endoteliais. Wang *et al.*<sup>46</sup> mostraram que o tratamento prévio de células endoteliais por altas temperaturas ou por arsenito de sódio as tornou mais resistentes à necrose induzida pela ação de polimorfonucleares. Como se sabe<sup>47,48</sup>, a lesão endotelial mediada por neutrófilos e a necrose através da liberação de ROM, além de enzimas proteolíticas (como a elastase), têm importante papel na gênese de lesões pulmonares agudas na vigência da SIRS.

Um ponto importante, a respeito da HSR, é o seguinte: as células levam algum tempo (6 a 18 horas) para desenvolver plenamente a produção das HSP. Do ponto de vista clínico, o desenvolvimento do fenótipo termotolerante, de um modo relevante, requereria ao menos este intervalo de tempo. Embora isto ainda não exista, mesmo que se consiga um método farmacológico confiável e aplicável clinicamente, capaz de suscitar a HSR, a aplicabilidade fugiria, em boa medida, do terreno das urgências. Por outro lado, encontraria aplicação provável nos estresses programados, tais como grandes intervenções cirúrgicas<sup>9</sup>.

As queimaduras representam um tipo de lesão que pode ter altas taxas de morbidez e mortalidade. Associam-se, especialmente nos casos graves, a APR, com os conseqüentes aumentos de níveis circulantes de citocinas, como a IL-6 e o TNF- $\alpha$ <sup>49</sup>. A IL-2 tem seus níveis reduzidos<sup>50</sup>. O aprofundamento da APR traz a sepse e a MODS, ocorrendo em cerca de 20% dos casos com queimaduras graves<sup>51</sup>, especialmente naqueles com mais de 70% de superfície corporal queimada<sup>52</sup>. Os metabólitos reativos de oxigênio (ROM) têm grande papel na produção das lesões orgânicas da MODS. O choque térmico protege órgãos contra muitas lesões associadas com a produção aumentada de citocinas e

ROM<sup>24</sup>. Em pacientes queimados, um trabalho<sup>53</sup> demonstrou a presença de anticorpos anti-HSP-70, sem que o significado e a influência deste achado tenham sido determinados.

## CONCLUSÕES

Nos últimos anos, um extenso cabedal de conhecimentos vem se acumulando a respeito de como as células, desde as mais primitivas até as mais evoluídas, são capazes de elaborar respostas complexas de defesa, quando desafiadas por diversos tipos de estresse. Embora ainda exista muito a ser descoberto, elucidado e conhecido em detalhes, já há também muita coisa esclarecida. Estes progressos admiráveis têm feito com que a compreensão de doenças, síndromes e fenômenos de natureza obscura seja cada vez maior. Diversas linhas de pesquisa poderão conduzir no futuro aos seguintes benefícios:

- a) tratamento mais eficaz das isquemias do miocárdio, com menores índices de necrose e perdas funcionais, bem como redução de mortalidade;
- b) possibilidade de diminuição também das lesões produzidas nas isquemias cerebrais;
- c) aumento da citoproteção em órgãos como estômago, pâncreas e rins;
- d) queda da morbidez e mortalidade da SARA, hoje tão elevadas;
- e) melhor compreensão e melhores resultados no tratamento da SIRS, desaguadouro de múltiplos estados de complicações em trauma, cirurgia e sepse;
- f) possibilidade de melhor preparação de pacientes para grandes intervenções cirúrgicas eletivas.

Dentre as respostas celulares ao estresse hoje conhecidas, a HSR parece ser aquela que mais benefícios potenciais poderá gerar. É fácil entender que, sendo as proteínas as substâncias básicas mais importantes nas funções celulares, sua desnaturação pode acarretar lesões sérias, enquanto sua preservação e defesa podem aumentar a resistência das células e organismos contra uma longa série de lesões. Estas terminam por induzir necrose ou apoptose celulares por caminhos que são convergentes e comuns, independentemente do mecanismo inicial das doenças ou eventos traumáticos.

Conhecer melhor o que ocorre no nível molecular é o caminho inevitável para todos quantos queiram ter compreensão global de temas tão relevantes quanto os acima mencionados. O progresso nesta área tem sido tão rápido quanto excitante, só não sendo maior do que aquilo que permanece ignoto.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Prof. Ênio Cardillo Vieira, Chefe do Departamento de Bioquímica do I.C.B.U.F.M.G., pela revisão inicial do trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wynn RM, Davie Jr, Cox, RP, Chuang DT. Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. *J Lab Clin Med* 1994; 124:31-6.
- Ritossa F.A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18:571-3.
- Jäättelä M, Wissing D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann Med* 1992; 24:249-58.
- Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 1992; 72:1.063-81.
- Sato H, Yamaguchii M, Shibasaki T *et al*. Induction of stress proteins in mouse peritoneal macrophages by the anti-rheumatic agents gold sodium thiomalate and auranofin. *Biochem Pharm* 1995; 49:1.453-7.
- Peetermans WE. Heat shock proteins in medicine. *Acta Clin Belg* 1995; 50:131-6.
- Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO *et al*. Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer* 1994; 30:1.884-91.
- Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:6.455-9.
- Minowada G, Welch WI. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 1995; 95:3-12.
- Lee BS, Chen J, Angelidis, C *et al*. Pharmacological modulation of heat shock factor 1 by antiinflammatory drugs results in protection against stress - induced cell damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7.207-11.
- Jurivich DA, Pachetti C, Qiu L, Welk JF. Salicylate triggers heat shock factor differently than heat. *J Biol Chem* 1995; 270:24.489-95.
- Feige U, Polla BS. Hsp70 - a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia* 1994; 50: 979-86.
- Ellis RJ. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 1987; 328:378-9.
- Ellis RJ, Hartl FU. Protein folding in the cell: competing models for chaperonin function. *FASEB J* 1996; 10:20-6.
- Becker J, Craig EA. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 1994; 219:11-23.
- Terlecky SP. Hsp70 and lysosomal proteolysis. *Experientia* 1994; 50:1.021-25.
- Buchman TG. Manipulation of stress gene expression: a novel therapy for the treatment of sepsis? *Crit Care Med* 1994; 22:901-3.
- Applegate LA, Luscher P, Tyrrel, RM. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 1991; 51:974-78.
- Luethy JD, Fargnoli J, Park JS. *et al*. Isolation and characterization of the hamster gadd 153 gene. Activation of promoter activity by agents that damage DNA. *J Biol Chem* 1990; 265:16.521-6.
- Sganga G, Siegel JH, Brown G. *et al*. Reprioritization of hepatic plasma protein release in trauma and sepsis. *Arch Surg* 1985; 120:187-99.
- Udelsman R, Holbrook NJ. Endocrine and molecular responses to surgical stress. *Curr Probl Surg* 1994; 31:658-720.
- Buchman TG, Cabin DE. Molecular biology of circulatory shock III. *HepG2* cells demonstrate two patterns of shock-induced gene expression which are independent, exclusive and prioritized. *Surgery* 1990; 108:902-11.
- Hall TJ. Role of hsp70 in cytokine production. *Experientia* 1994; 50:1048-53.
- Jacquier-Sarlin MR, Fuller K, Dinh-Xuan AT. *et al*. Protective effects of hsp70 in inflammation. *Experientia* 1994; 50:1031-8.
- Jäättelä M. Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J Immunol* 1993; 151:4.286-94.
- Cristau B, Schafer PH, Perce SK. Heat shock enhances antigen processing and accelerates the formation of compact class II ab dimers. *J Immunol* 1994; 152:1.546-56.
- Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG. Heat shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation* 1993; 87:963-71.
- Willians RS, Benjamin IJ. Stress proteins and cardiovascular disease. *Mol Biol Med* 1991; 8:197-206.
- Morris SD, Cumming DVE, Latchman DS, Yellon DM. Specific induction of the 70-kD heat stress proteins by the tyrosine kinase inhibitor herbimycin-A protects rat neonatal cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1996; 97:706-12.
- Sloviter RS, Lowenstein DH. Heat shock protein expression in vulnerable cells of the rat hippocampus as an indicator of excitation-induced neuronal stress. *J Neurosci* 1992; 12:3004-9.
- Barbe MF, Tyttell M, Gower DJ, Welch WJ. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science* (Wash DC) 1988; 241:1.817-20.
- Zeniya A, Otaka M, Itoch H *et al*. Induction and intracellular localization of a 72-kDa heat shock protein in rat gastric mucosa after water-immersion stress. *J Gastroenterol* 1995; 30:572-7.
- Nakamura K, Rokutan K, Marui N *et al*. Induction of heat shock proteins and their implication in protection against ethanol-induced damage in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Gastroenterology* 1991; 101:161-6.
- Otaka M, Itoh H, Kuwabara T *et al*. Induction of heat shock protein and prevention of caerulein-induced pancreatitis by water-immersion stress in rats. *Int J Biochem* 1994; 26:805-11.
- Emami A, Schwartz JH, Borkan S. Transient ischemia or heat stress induced a cytoprotectant protein in rat kidney. *Am J Physiol* 1991; 260:479-85.
- Silva CL, Pietro RLR, Januario, A *et al*. Protection against tuberculosis by bone marrow cells expressing mycobacterial hsp65. *Immunology* 1995; 86:519-24.
- Kauffmann SHE. Heat shock proteins and autoimmunity: fact or fiction? *Curr Biol* 1991; 1:359-61.
- Welch WJ. How cells respond to stress. *Scientific American* 1993; 268:56-62.
- Gordon CB, Li D, Stagg CA *et al*. Impaired wound healing in Cushing's syndrome: the role of heat shock proteins. *Surgery* 1994; 116:1.082-7.
- Udelsman R, Blake MJ, Holbrook NJ. Molecular response to surgical stress: specific and simultaneous heat shock protein induction in the adrenal cortex, aorta and vena cava. *Surgery* 1991; 110:1.125-31.
- Gunby P. Graying of America stimulates more research on aging-associated factors. *JAMA* 1994; 272:1.561-6.
- Garramone Jr RR, Winters RM, DAS DK, Deckers PJ. Reduction of skeletal muscle injury through stress conditioning using the heat-shock response. *Plast Reconstr Surg* 1994; 93:1.242-7.
- Koenig WJ, Lohner RA, Perdrizet GA *et al*. Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery. *Plast Reconstr Surg* 1992; 90:659-64.
- Villar J, Ribeiro SP, Mullen JBM *et al*. Induction of the heat

- shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. *Crit Care Med* 1994; 22:914-21.
45. Ribeiro SP, Villar J, Downey GP *et al.* Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF- $\alpha$  posttranslational regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1843-50.
46. Wang JH, Redmond HP, Watson WG *et al.* Induction of heat shock protein 72 prevents neutrophil-mediated human endothelial cell necrosis. *Arch Surg* 1995; 130:1.260-5.
47. Baird BR, Cheronis JC, Sandhaus RA *et al.* O<sub>2</sub> metabolites and neutrophil elastase synergistically cause edematous injury in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1986; 61:2.224-9.
48. Lechin AE, Varon J. Adult respiratory distress syndrome (ARDS): the basics. *J Emerg Med* 1994; 12:63-8.
49. Drost AC. Plasma cytokines after thermal injury and their relationship to infection. *Ann Surg* 1993; 218:74.
50. Sun Shi-Rong. Changes in expression of IL-2 and IL-2R on lymphocytes in burn patients. *Chin J Plast Surg Burns* 1992; 8:185.
51. Feng Guang-Zhen. Multiple system organ failure after severe burns. *Chin J Plast Surg Burns* 1992; 8:13.
52. Yang Zong-Cheng. Clinical study of the pathogenesis of multiple system organ failure after burns. *Chin J Plast Surg Burns* 1992; 8:8.
53. Qureishi T, Nagarwalla N, Sarela A *et al.* Antibodies to the 70-kDa heat-shock protein in patients with thermal burns. *Clin Immunol Immunopath* 1995; 75:94-8.