

# PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO Hsp 70: ESTRUTURA E ATUAÇÃO EM RESPOSTA AO ESTRESSE CELULAR

[Heat shock protein Hsp70: structure and action in response to cellular stress]

Simone Vieira Castro<sup>1\*</sup>, Carlos Henrique Lobo<sup>2</sup>, José Ricardo de Figueiredo<sup>1</sup>, Ana Paula Ribeiro Rodrigues<sup>1</sup>

1 Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,

2 Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias.

**RESUMO:** Todas as células possuem mecanismos específicos para defender-se das agressões e condições estressantes impostas pelo ambiente. As proteínas de choque térmico (Hsp), além de auxiliar na síntese e dobramento de diversas outras proteínas em condições normais, representam um dos mecanismos mais conservados ativado em respostas a diversos tipos de estresse. Neste contexto, esta revisão aborda aspectos relacionados à descoberta e estrutura das proteínas Hsp, com destaque para a atuação da família Hsp70 na resposta celular ao estresse, interação com as vias apoptóticas, bem como a influência da criopreservação sobre a expressão destas proteínas.

**Palavras-Chave:** Apoptose, criopreservação, chaperona

**ABSTRACT:** All cells have specific mechanisms to defend itself from aggression and stressful conditions imposed by the environment. The heat shock proteins (Hsp), besides aiding in the synthesis and folding of several other normally represent one of the most conserved mechanisms activated in response to various types of stress. In this context, this review discusses aspects related to the discovery and structure of Hsp proteins, highlighting the role of Hsp70 in the cellular response to stress, interaction with apoptotic pathways, as well as the influence of cryopreservation on the expression of these proteins.

**Keyword:** Apoptosis, cryopreservation, chaperone

## INTRODUÇÃO

Os organismos vivos, independente do reino, são constantemente submetidos a diversas situações estressantes e respondem a esses estímulos por meio de alterações no metabolismo celular, ativando seus mecanismos de defesa. A primeira resposta de um organismo a qualquer estresse ambiental acontece bioquimicamente, a qual subjaz todos os efeitos de maior nível organizacional. A resposta ao estresse compreende a atuação de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (Hsp – Heat Shock Proteins), sendo esta uma das respostas primárias de proteção celular (LINDQUIST & GRAIG, 1988). As Hsp fazem parte da grande família das proteínas conhecidas como chaperonas moleculares, assim chamadas por possuir a capacidade de interagir de forma reversível com outras proteínas, auxiliando na formação, dobramento e transporte trans-membrana (KARP, 2005). Inicialmente as Hsp foram identificadas como proteínas induzidas pelo estresse térmico (RITOSSA, 1962), contudo foi

verificado que se trata não só de um componente crítico de um mecanismo de defesa complexo e altamente conservado, como também desempenha papel fundamental tanto durante a síntese, montagem, dobramento e degradação de proteínas, quanto na preservação da sobrevivência celular sob condições ambientais adversas (GUPTA et al., 2007).

Em condições adversas, como por exemplo, o aumento de temperatura, estresse osmótico ou oxidativo, os níveis de Hsp são aumentados, auxiliando, desta forma, a síntese e maturação de novas proteínas que irão substituir aquelas afetadas pelo estresse metabólico (BUKAU & HORWICH, 1998). As Hsp também fornecem subsídio às células para identificar e facilitar o redobramento de proteínas danificadas ou destiná-las a um sistema proteolítico adequado, facilitando a eliminação de proteínas cujos danos não são passíveis de restauração (MEYER & BUKAU, 2005). O aumento de Hsp nas células lesadas, além de auxiliar no reparo de proteínas, apresenta um

\* Autor para correspondência. Email: simone\_medvet@hotmail.com

importante papel na manutenção da viabilidade uma vez que inibe a apoptose. Já foi demonstrado que as Hsp70 interagem diretamente com elementos da via apoptótica, seja ela intrínseca ou extrínseca, inibindo a cascata de eventos que culminam com a morte celular (MOSSER et al., 1997). Dentre os genes da família de resposta ao choque térmico, o *HSP70* é um dos genes altamente conservados e o primeiro a ser induzido em resposta a diversos fatores estressantes (MUKHOPADHYAY et al., 2003). Diante da grande relevância da atuação desta família de proteínas sobre o metabolismo celular, bem como a atuação peculiar em condições adversas, o presente trabalho tem por objetivo relatar a estrutura das proteínas Hsp70, e contextualizar sua atuação na resposta ao estresse e influência na apoptose, a qual é uma forma de morte celular extremamente comum e indispensável para o desenvolvimento apropriado e para a homeostase do tecido em todos os organismos multicelulares.

#### Descoberta das proteínas de choque térmico

Na década de 60 em um estudo com glândulas salivares de *Drosophila melanogaster*, foi demonstrado que o estresse térmico ou químico induzia a expressão de genes quiescentes, levando a célula estressada a produzir uma grande quantidade de uma determinada classe de proteínas com peso molecular de 70 kD (RITOSSA, 1962). Doze anos depois Tissiere et al. (1974), utilizando o mesmo tipo celular para o estudo do estresse térmico, avaliaram a relação entre a síntese protéica e a presença de “puffs” cromossômico, que representam regiões do cromossomo em que há ativação gênica com intensa produção de RNA. Estes autores também encontraram um elevado nível das mesmas proteínas específicas relatadas por Ritossa (1962) e denominaram-nas de Heat Shock Proteins (Hsp), ou proteínas do choque térmico. Posteriormente, verificou-se que o aumento da síntese de Hsp70 não ocorre unicamente em função do aumento de temperatura, podendo estar relacionada também à resposta a isquemia, presença de metais pesados (SOMERO, 1995); tolerância à endotoxina (CHI & MESTRIL, 1996) e à radiação ultravioleta (SIMON et al., 1995); tumorigenicidade (JAATTELA, 1995); proliferação celular (FEDER et al., 1992); resistência à apoptose (WYATT et al. 1996); processos patológicos como infecções virais, bacterianas e parasitárias, bem como doenças auto-imunes e venenos metabólicos, que de alguma forma resultem no comprometimento da função das proteínas (WELCH, 1992). No entanto, apesar de diversos fatores induzirem o aumento de Hsp70, a distribuição intracelular desta proteína é diferente dependendo do tipo de estresse. Essa translocação diferencial em resposta a cada tipo de agressão

sofrida sugere uma distinção na atuação da Hsp70 frente às diversas condições estressantes (DASTOOR & DREUER, 2000).

As Hsp são encontradas desde seres procariotos (bactérias e Archaea) até os eucariotos (desde leveduras até primatas), sendo um indício da vital importância biológica desta classe proteica. Seu alto grau de conservação sugere o desempenho de um papel essencial no processo celular (KREGEL, 2002), uma vez que proteínas envolvidas em processos metabólicos vitais geralmente apresentam poucas mutações ao longo da evolução das espécies (HARTL, 2007).

As Hsp podem ser agrupadas em seis famílias: pequenas Hsp, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp100, de acordo com suas sequências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (em kD), determinados pelo método SDS-PAGE (FULLER et al., 1994). Em cada família há diferentes proteínas, como por exemplo, Hsp72 e Hsp73 no grupo Hsp70, que apesar de possuírem pesos moleculares similares, tem padrões de indução e expressão distintos. A família Hsp70 é a mais conservada filogeneticamente, sendo de fundamental importância para o dobramento de proteínas nas células (WYNN et al., 1994). Além disso, é conhecida como a proteína com maior atuação em resposta ao estresse celular, sendo utilizada em muitos estudos como indicadora de estresse (TIRELLI et al., 2005; STINSHOFF et al., 2009; TARUTHUM et al., 2010; COLE & MEYERS, 2011; MONZO et al., 2012).

#### Família das proteínas Hsp70

As Hsp70 compõem uma grande família de proteínas comumente associadas ao início e duração da tolerância à temperatura. Essas proteínas atuam na montagem, transporte e regulação da atividade de proteínas através de sua interação com os segmentos peptídicos hidrofóbicos das proteínas num processo regulado por ATP (MEYER & BUKAU, 2005). Os quatro principais representantes da família Hsp70 são: i) Hsp72; ii) Hsp73; iii) Grp 78 kD e iv) Grp 75 kD. A Hsp73 é expressa constitutivamente em todas as células e está presente tanto no núcleo como no citoplasma celular (BECKMANN et al., 1990). Já a Hsp72 é o principal membro da família expresso em resposta ao estresse, sendo verificado um aumento significativo dos seus níveis até seis horas após a exposição ao fator estressante (OGATA et al., 2009). A Grp 78 kD (proteínas reguladas por glicose), também denominada de BiP (Binding immunoglobulin protein) ou HSPA5, localiza-se no lúmen do retículo endoplasmático, desempenhando papel fundamental na translocação proteica. Por outro lado, a Grp 75 kD (HSPA9 ou PBP74) é encontrada no interior das mitocôndrias e além de

atuar na resposta ao estresse, participa em outros processos celulares importantes como o controle de diferenciação celular, proliferação e tumorigênese (WADHWA et al., 2002).

Outros membros da família Hsp70 já foram identificados e investigados. O Mortalin (Mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75), um membro da família Hsp70, foi identificado pela primeira vez na fração citoplasmática de fibroblastos normais de camundongos CD1-ICR (WADHWA et al., 1993) e posteriormente indicado sua localização prioritária em mitocôndrias e no retículo endoplasmático (RAN et al., 2000). Embora os aspectos funcionais da mortalin ainda não sejam elucidados, essa proteína parece desempenhar um papel central na regulação do ciclo celular, além de atuar na tumorigênese por interação com a proteína p53, influenciando sua translocação celular (Yi et al., 2008). Recentemente, foi demonstrado em peixe zebra que a HspA12B, um membro distante da família Hsp70 que possui um domínio ATPase atípico (HAN et al., 2003), desempenha um papel crucial no desenvolvimento de células endoteliais e na angiogênese *in vivo* e *in vitro*, influenciando os níveis de fosforilação da proteína quinase B (Akt), um dos eventos chave na transdução de diversos sinais angiogênicos (HU et al., 2006).

### Estrutura geral

A Hsp70 é composta por um domínio ATPase e um domínio de ligação ao substrato (Figura 1). O domínio de ligação ao substrato de 25 kD (SBD) localiza-se na região C-terminal, cujo acesso ao substrato é controlado por uma tampa C-terminal que expõe o sítio de ligação aos peptídeos. Através de uma ligação hidrofóbica flexível o domínio SBD é unido ao domínio N-terminal com atividade ATPase (NBD) (KAMPINGA & CRAIG, 2010). O estado do nucleotídeo (ATP ou ADP) ligado ao domínio NBD estão associados com a afinidade de ligação do domínio SBD, desta forma, a regulação alostérica deste sítio, bem como a interação com proteínas auxiliares (co-chaperonas) e fatores de troca de nucleotídeos (NEF) dependem da conformação do sítio NBD (JIANG et al., 2007; VOS et al., 2008). No entanto, estudos mais recentes avaliando a estrutura do NBD de diversos membros da família Hsp70 demonstraram que este domínio é altamente conservado e que tem pouca contribuição na especificidade das proteínas, sendo este papel desempenhado pelo sítio SBD e por proteínas acessórias (WISNIEWSKA et al., 2010).

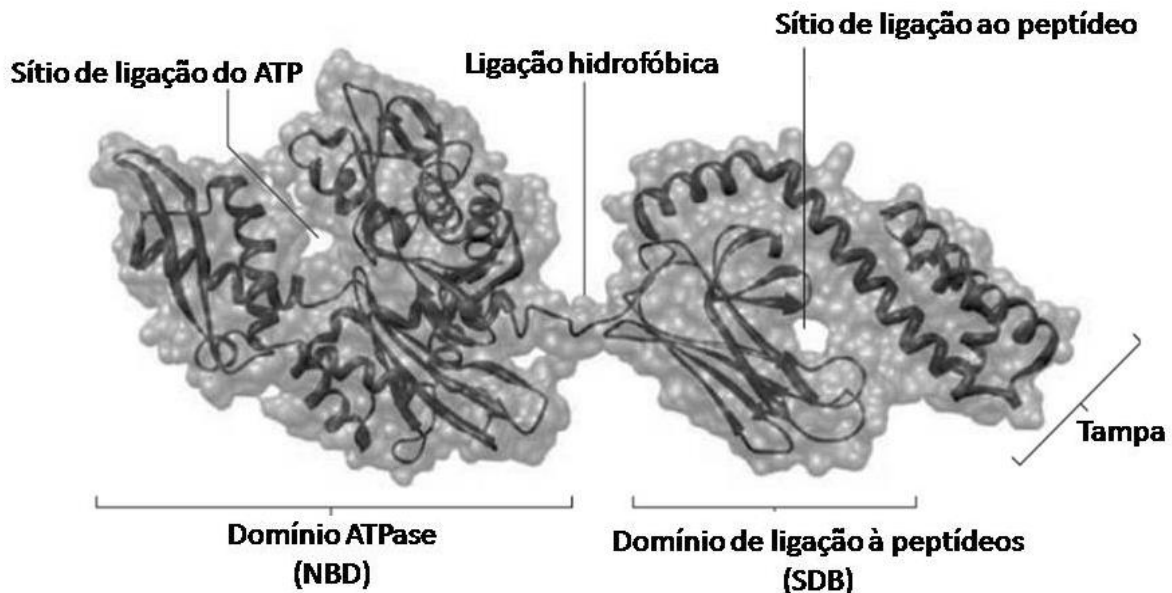


Figura 1 - Estrutura da Hsp70 com domínio de ligação ao substrato (SDB) e domínio ATPase (NBD) ligados por uma sequência hidrofóbica (KAMPINGA & CRAIG, 2010).

O domínio SBD é responsável pela ligação ao substrato, também denominado de proteína cliente, portanto interagindo de forma reversível com outras proteínas ou cadeias polipeptídicas recém-sintetizadas. Dessa forma, as Hsp em células

submetidas a condições adversas evitam que proteínas desnaturadas formem agregados citoplasmáticos que ponham em risco a integridade estrutural da célula; guiando à renaturação de proteínas e, quando isso não for possível,

conduzindo as proteínas desnaturadas à degradação pelos proteossomos. Além disto, esta capacidade de interação com outras proteínas permite que as Hsp inibam diretamente a atividade de mediadores da via apoptótica, tanto intrínseca quanto extrínseca, prevenindo o desencadeamento da apoptose (BEERE et al., 2000).

### **Mecanismo de ativação gênica para produção de Hsp70**

As proteínas Hsp70 são codificadas por uma família multigênica altamente conservada. Em plantas, cerca de 12 a 14 genes codificam proteínas Hsp70, cujo sequenciamento demonstra haver quatro subgrupos com distribuição intracelular distinta: citosol, retículo endoplasmático, plastos e mitocôndrias (SUNG et al., 2001). Com o sequenciamento do genoma humano, verificou-se a existência de 47 sequências de Hsp70 (BROCCHIERI et al., 2008) nesta espécie. Porém 30 destas sequências são ditas como pseudogenes, ou seja, não resultam na produção de proteínas. Portanto, pelo menos 17 genes distintos localizados em vários cromossomos são traduzidos nas diversas isoformas destas proteínas (KABANI & MARTINEAU, 2008). Acredita-se que nas demais espécies, embora não haja um levantamento exato da quantidade, também estejam presentes diversos genes codantes ou codificantes em vários cromossomos.

A ativação dos genes codificantes das Hsp requer um controle por parte de proteínas transregulatórias denominadas fator de choque térmico (Hsf), cuja ativação e translocação são responsáveis pelo reconhecimento do elemento de choque térmico (Hse). O Hsf está presente normalmente na célula na forma de um monômero inativo. Em resposta ao acúmulo de proteínas incorretamente dobradas em função de algum tipo de estresse, ocorre uma rápida trimerização dos monômeros Hsf (SANTORO, 2000). Esse trímero formado é translocado para o núcleo, onde é capaz de reconhecer e ligar-se imediatamente a uma sequência de nucleotídeos específica, o Hse, que está localizada na região promotora dos genes que codificam as Hsp, resultando desta forma, num alto nível de transcrição dos genes do choque térmico (Figura 2).

A estrutura da Hsf foi elucidada por cristalografia, primeiramente no fungo *Kluyveromyces lactis* (DAMBERG et al., 1994). Atualmente, já são conhecidas pelo menos cinco isoformas da Hsf, contudo, estudos demonstraram que a atuação

destas Hsf se dá por meio de alguns elementos funcionais, que são conservados na sequência proteica independente da isoforma (HUBL et al., 1994; TORRES & BONNER, 1995). Dentre estes elementos podemos destacar o domínio de ligação ao DNA (DBD do inglês DNA binding) com cerca de 90 resíduos e responsável pelo reconhecimento de uma sequência específica de nucleotídeos (Hse) na região promotora do gene *HSP70* (NIETO-SOTELO et al., 1990), a região regulatória (RR), que promove a trimerização do Hsf (BONNER et al., 1992) e a região amino-terminal ARI, responsável pela ativação transcricional de genes que possuem o Hse (BULMAN et al., 2001).

### **Participação da Hsp70 na resposta ao estresse e na apoptose**

O elevado nível de Hsp em células submetidas ao estresse, além de orientar o dobramento de proteínas recém-sintetizadas, atua na renaturação de proteínas danificadas (MEYER & BUKAU, 2005). O mecanismo de reparo proteico promovido pela Hsp70 envolve ciclos de dobramento, similar ao que ocorre em cadeias peptídicas recém-sintetizadas, sendo imprescindível para o restabelecimento da homeostasia celular. Ademais, a Hsp70 apresenta um importante papel na manutenção da viabilidade uma vez que inibe a apoptose (MOSSER et al., 1997) como mostrado nos tópicos a seguir.

### **Reparo de proteínas lesadas**

As proteínas representam o componente mais abundante nas células e mais diversificado quanto à forma e função. Essas macromoléculas como são conhecidas, desempenham as mais variadas funções, como, por exemplo, participam desde a organização estrutural, formando o esqueleto celular, até os processos metabólicos vitais. Nesse contexto, a manutenção e/ou recuperação da estrutura proteica é de suma importância para garantir a sobrevivência celular sob condições adversas. Na resposta ao estresse celular, as Hsp70 influenciam o dobramento de proteínas, orientando a renaturação e prevenindo a agregação proteica por meio da interação com as partes hidrofóbicas expostas da proteína alvo ou cliente. Este mecanismo de dobramento é realizado em ciclos de ligação e liberação do substrato, que são acelerados pela hidrólise do ATP e modulados por co-chaperonas que interagem com Hsp70 e regulam a atividade da ATPase (MOSSER & MORIMOTO, 2004).

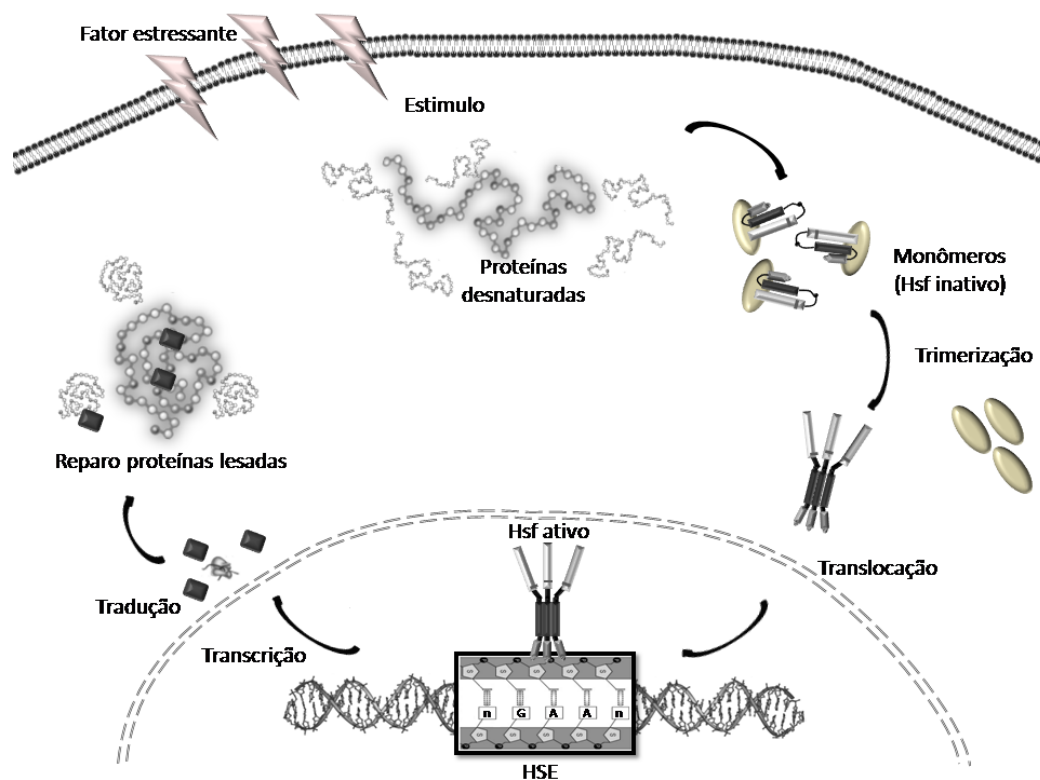


Figura 2- Representação esquemática do mecanismo de ativação gênica Hsf-Hse. Diversos fatores como estresse osmótico, oxidativo e exposição à radiação causam desnaturação protéica. As proteínas desnaturadas estimulam a trimerização do Hsf, que uma vez ativo liga-se ao Hse na região promotora do gene *HSP70* e induz a produção da proteína Hsp70.

O mecanismo de atuação da Hsp70 no “dobramento” de proteínas envolve a co-chaperona Hsp40 (também conhecida por proteína J) e o fator de troca de nucleotídeos (NEF) (BUKAU et al., 2006). Inicialmente, a Hsp40 liga-se ao substrato, em seguida, o complexo *Hsp40-substrato* interage com o domínio de ligação de peptídeos da Hsp70. Esta interação só é permitida quando o domínio ATPase da Hsp70 encontra-se ligado a uma molécula de ATP. A ligação do substrato em conjunto com Hsp40 estimula a hidrólise do ATP, causando uma alteração conformacional na parte helicoidal ao longo da fenda do sítio de ligação, com consequente dobramento do substrato. A hidrólise do ATP e alteração na estrutura conformacional, reduz a afinidade de ligação com a Hsp40, fazendo com que essa proteinase desligue do complexo. Posteriormente, o NEF liga-se à Hsp70 auxiliando na substituição da molécula de ADP formada por uma molécula de ATP. Após a ligação Hsp70-ATP o substrato é liberado, caso a conformação nativa da proteína não seja alcançada, a Hsp40 religa-se às regiões hidrofóbicas expostas dando início a um novo ciclo de dobramento, até que a estrutura proteica esteja completamente recuperada (KAMPINGA & CRAIG, 2010).

### Interação da Hsp70 com as vias apoptóticas

Paradoxalmente, as células acometidas por algum tipo de dano podem seguir em caminhos opostos: respondendo ao estresse amenizando novos danos e facilitando a recuperação com a finalidade de manter a sobrevivência celular, ou sinalizando para a apoptose, uma forma de morte celular programada, que remove as células lesadas sem desencadear um processo inflamatório (FERREIRA et al., 2004). A interação entre estas duas vias é determinante para as consequências biológicas do estresse sofrido. O avanço no conhecimento sobre as vias apoptóticas fornece subsídio para examinar como a Hsp70 pode conferir suas propriedades citoprotetoras. Estudos têm demonstrado que o mecanismo de proteção das Hsp vai além da função de chaperonas moleculares, tendo a capacidade de modular a susceptibilidade das células a estímulos nocivos por interação com elementos diretamente envolvidos na via apoptótica (BEERE et al., 2000).

O processo de apoptose pode ser desencadeado por duas vias distintas, ou seja, a via intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca é caracterizada pelo aumento da permeabilidade da membrana externa das mitocôndrias com consequente liberação de fatores pró-apoptóticos, dentre eles o citocromo *c* e o fator indutor de apoptose (AIF – apoptosis inducing factor) (YANG et al., 1997). Uma vez no

citossol, o citocromo *c* liga-se ao fator ativador da protease apoptótica (Apaf-1). O Apaf-1 ativado recruta e ativa moléculas de pró-caspase 9 (caspase iniciadora), formando um complexo proteico denominado, apoptossoma. O apoptossoma por sua vez, atua clivando a pró-caspase 3 (caspase efetora), tornando-a apta a exercer sua atividade proteolítica culminando na apoptose (BEERE, 2004).

A via extrínseca por outro lado, é iniciada pela interação de determinados ligantes aos receptores de morte na superfície celular. Estes receptores pertencem à família dos receptores do Fator de

Necrose Tumoral (TNF), contendo um domínio citoplasmático (necrose death domain – DD) que tem um papel de extrema importância na transmissão do sinal, desencadeando uma série de eventos que resulta na cascata de ativação de enzimas pró-apoptóticas. Dentre estes eventos está o processamento da pró-caspase 8 em sua forma ativa. A caspase 8 ativa atua na clivagem da proteína tBid na forma ativa Bid, esta por sua vez atua sobre a mitocôndria estimulando a liberação de fatores apoptóticos. Além disso, o domínio DD está envolvido na ativação de outras proteínas sinalizadoras como a ASK I e JNK (Figura 3 - BEERE, 2004).

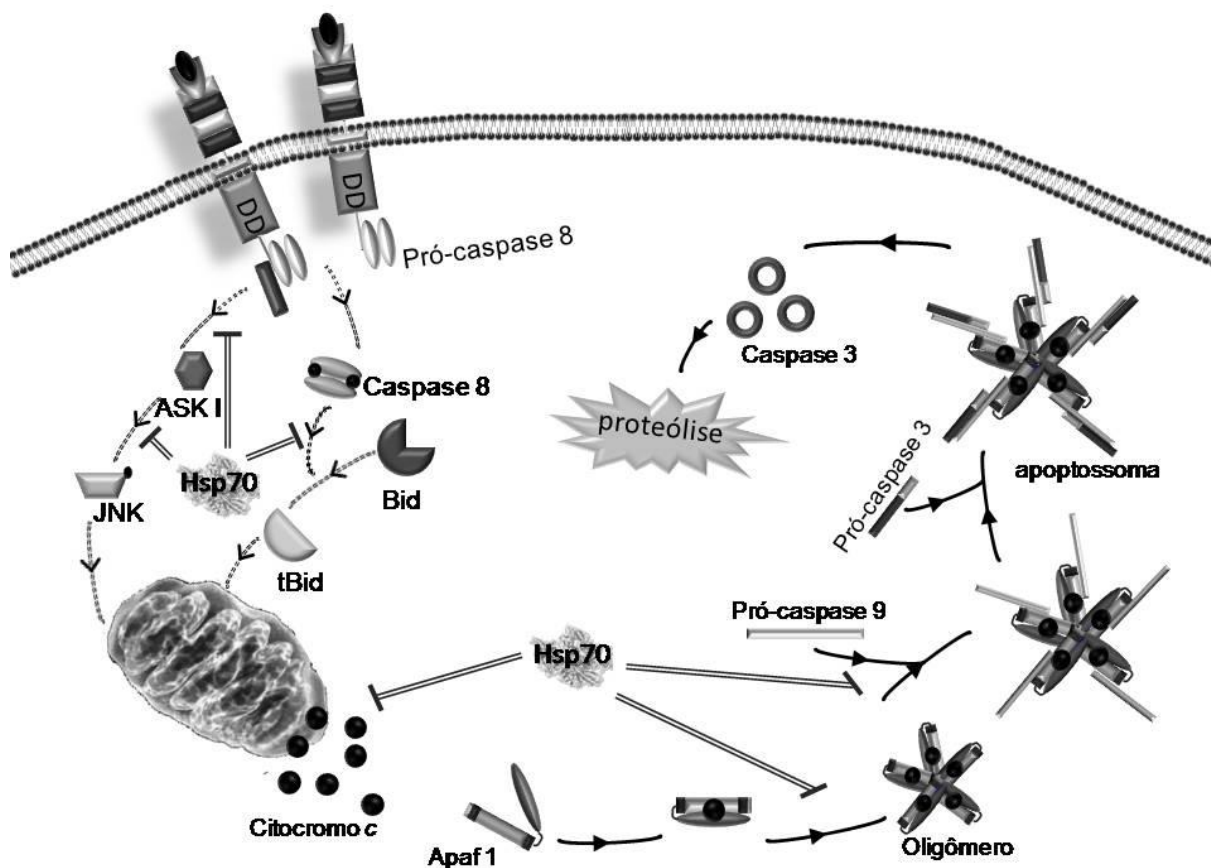


Figura 3: Representação esquemática das vias apoptóticas extrínseca (linha pontilhada) e intrínseca (linha contínua), demonstrando os diferentes pontos em que a Hsp70 atua para inibir o desencadeamento da apoptose.

A super expressão de Hsp70 pode prevenir a apoptose induzida pelo estresse, através da inibição do processamento das pró-caspases 9 e 3 (MOSSER et al., 1997). Estudos mais recentes comprovaram que a super expressão da HSP70 também atua na via apoptótica intrínseca por meio da prevenção da perda do potencial da membrana mitocondrial externa, o que impede a liberação de citocromo *c* e do AIF a partir da mitocôndria (CREAGH et al., 2000). Já foi comprovado que a Hsp70 atua na via extrínseca da apoptose, inibindo a ativação de moléculas sinalizadoras secundárias como a proteína Bip e a JNK (c-Jun NH2-terminal

protein kinase), que estão envolvidas na cascata desencadeada pela ativação dos receptores de morte presentes na membrana celular (TOURNIER et al., 2000). Além disso, a Hsp 70 em associação com co-chaperonas Hsp40 pode interferir no balanço de proteínas pró (Bax, Bad, Bid) e anti apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, A1). Na via intrínseca da apoptose, a proteína apoptótica Bax forma poros na membrana mitocondrial externa, permitindo a liberação de elementos da cascata da apoptose. Comprovadamente, a translocação da proteína apoptótica Bax, para a membrana mitocondrial é inibida pela Hsp70, conseqüentemente a apoptose é

prevenida (GOTOH et al., 2004). A avaliação da morte celular programada em células embrionárias em desenvolvimento revelou que os níveis de Hsp70 estão diretamente correlacionados com a apoptose, sendo acometida prioritariamente células com menores níveis de Hsp70 (DE LA ROSA et al., 1998), o que sugere um papel importante desta proteína durante a embriogênese.

A promoção da sobrevivência pela Hsp70 tem sido atribuída à sua capacidade de inibir o desencadeamento da apoptose em resposta a vários estímulos, incluindo calor, danos à molécula de DNA e ativação de receptores específicos de morte (BEERE, 2004). Embora não seja bem elucidado, é possível que estas proteínas estejam envolvidas na criotolerância ou sobrevivência de células submetidas aos procedimentos de criopreservação.

### **Expressão de Hsp70 em gametas criopreservados**

No sistema reprodutivo, a Hsp 70 é citada como uma das famílias de Hsp mais importantes (NEUER et al., 2000), estando envolvida em processos desde a formação dos gametas até a fertilização, desenvolvimento embrionário e gestação (MARIANI et al., 2000; BERRUTI & MARTEGANI, 2001; MATWEE et al., 2001; BROWNE et al., 2007). Estudos anteriores demonstraram que ocorre um acúmulo de Hsp70 durante a espermatogênese (ALLEN et al., 1988), cuja importância foi comprovada pelo bloqueio do gene *HSP70* em camundongos, resultando em falha da meiose, apoptose das células germinativas e infertilidade (DIX et al., 1996).

Especificamente, relacionado à criopreservação, os trabalhos encontrados na literatura ainda são escassos e contraditórios. Com base no fato de que o processo de criopreservação representa uma condição estressante para a célula, o esperado seria um aumento das proteínas Hsp70. Essa suposição baseia-se no fato do estresse osmótico promovido pela adição de agente crioprotetor (FAUSTINO et al., 2011), bem como pelo estresse térmico causado pela variação da temperatura e o estresse oxidativo, que promove a peroxidação lipídica (LUZ et al., 2011). Em um estudo recente, comparando-se a motilidade de espermatozoides murinos criopreservados e a expressão de Hsp, foi possível verificar um aumento na quantidade de Hsp70 fosforilada em resposta ao estresse osmótico decorrente da exposição à solução de criopreservação. Isso demonstra claramente que, no tipo celular estudado, a Hsp70 é ativada na tentativa de reparar os danos provocados pela criopreservação (COLE & MEYERS, 2011).

Surpreendentemente, de modo contrário ao esperado, Tirelli et al. (2005) relataram uma redução significativa nos níveis de Hsp70 após a criopreservação de células da granulosa isoladas. O baixo nível dessa proteína pode estar correlacionado com um aumento da apoptose desta células verificada após cultivo *in vitro* por 48 horas. Em oócitos caninos imaturos, Taruthum et al. (2010) ao avaliar a Hsp70 após vitrificação e cultivo *in vitro* de até 48h, verificaram uma forte expressão desta proteína imediatamente após o aquecimento e um decréscimo com o decorrer do cultivo, equiparando-se aos oócitos não criopreservados ao fim do período de incubação. Estudos mais recentes com embriões bovinos (STINSHOFF et al., 2009) e oócitos humanos em estágio de metáfase II (MONZO et al., 2012), demonstraram através da técnica de micro arranjo de DNA, que independente do método de criopreservação empregado, isto é, congelamento lento ou vitrificação, ocorre uma alteração na expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo de proteínas, ciclo celular e crescimento, dentre eles o *HSP70*, que interessantemente, em embriões bovinos, apresentou uma redução significativa na sua expressão.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As mudanças no ambiente intra ou extracelular podem ser desencadeadas por uma variedade de sinais, incluindo danos ao DNA, resposta aos estresses, térmico, osmótico, e oxidativo, dentre outras injúrias. Esses sinais são interpretados e desencadeiam uma apropriada resposta biológica, coordenados por eventos que envolvem uma série de alterações conformacionais, multimerização e mudanças na localização de proteínas. Todos estes parâmetros são sujeitos à regulação pelas Hsp, que constitui um mecanismo fundamental de proteção celular. Portanto, aprofundamento dos conhecimentos acerca da Hsp é essencial para que além de utilizá-la como marcador inicial de injúrias, possamos compreender melhor os mecanismos de defesa exercidos pelas células em diferentes condições adversas, como por exemplo, no processo de criopreservação.

A criopreservação é um segmento da criobiologia de suma importância para a preservação de material genético e conseqüente flexibilização de diversas técnicas de reprodução assistida, como a fecundação *in vitro*, transferência embrionária, transferência nuclear e outras. No entanto o procedimento de criopreservação representa uma condição estressante para as células. Desta forma, o entendimento da atuação das Hsp70 pode contribuir nos estudos de criobiologia, visando o estabelecimento de protocolos cada vez mais eficientes e menos agressivos. A elucidação acerca

do envolvimento da Hsp70 no processo de criopreservação também traz uma perspectiva de utilização do seu poder de citoprotetor para o aperfeiçoamento de protocolos de manipulação celular *in vitro* de uma forma geral.

### REFERÊNCIAS

- Allen R L., O'Brien D A., Jones C C., Rockett D L., Eddy E M. 1998. Expression of heat shock proteins by isolated mouse spermatogenic cells. *Molecular and Cellular Biology*. 8(8) : 3260–3266.
- Beckmann R P., Mizzen L A., Welch W J. 1990. Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: implication for protein folding and assembly. *Science*. 248: 850-854.
- Beere H M. 2004. 'The stress of dyng': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science*. 117(13): 2641-2651.
- Beere H M., Wolf B B., Cain K., Mosser D D., Mahboubi A., Kuwana T., Taylor P., Morimoto R I., Cohen G M., Green D R. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology*. 2: 469–475.
- Berruti G. & Martegani E. 2001. MSJ-1, a mouse testis-specific DnaJ protein, is highly expressed in haploid male germ cells and interacts with the testis-specific heat shock protein Hsp70-2. *Biology or Reproduction*. 65: 488-495.
- Bonner J J., Heyward S., Fackenthal D L. 1992. Temperature-dependent regulation of a heterologous transcriptional activation domain fused to yeast heat shock transcription factor. *Molecular and cellular biology*. 12(3): 1021-1030.
- Brocchieri L., De Macario E C., Macario A J L. 2008. Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evolutionary Biology*. 8(19): 20p.
- Browne C L., Swan F B., Rankin E E., Calvert H., Griffiths S., Tytell M. 2007. Extracellular heat shock protein 70 has novel functional effects on sea urchin eggs and coelomocytes. *The Journal of Experimental Biology*. 210: 1275-1287.
- Bukau B. & Horwich A. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 92: 351-366.
- Bukau B., Weissman J., Horwich A. 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*. 125(3): 443-451.
- Bulman A L., Hubl S T., Nelson H C M. 2001. The DNA-binding domain of yeast heat shock transcription factor independently regulates both the N- and C-terminal activation domains. *The journal of biological chemistry*. 276(43): 40254-40162.
- Chi S H., Mestral R. 1996. Stable expression of a human HSP70 gene in a rat myogenic cell line confers protection against endotoxin. *American Journal Physiology*. 270(4): 1017-1021.
- Cole J A., Meyers, S A. 2011. Osmotic stress stimulates phosphorylation and cellular expression of heat shock proteins in rhesus macaque sperm. *Journal of Andrology*. 32(4): 402-410.
- Creagh E M., Carmody R J., Cotter T G. 2000. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Experimental Cell Research*. 257: 58–66.
- Dastoor Z., Dreyer J L. 2000. Nuclear translocation and aggregate formation of heat shock cognate protein 70 (Hsc70) in oxidative stress and apoptosis. *Journal of Cell Science*. 113(16): 2845-2854.
- De La Rosa E J., Vega-Nunez E., Morales A. V., Serna J., Rubio E., De Pablo F. 1998. Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro) insulin correlates with prevention of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(17): 9950-9955.
- Dix D J., Allen J W., Collins B W., Mori C., Nakamura N., Poorman-Allen P., Goulding E H., Eddy E M. 1996. Targeted gene disruption of HSP70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis and male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(8): 3264-3268.
- Faustino L R., Silva C M G., Rossetto R., Rodrigues G Q., Figueiredo J R., Rodrigues A P R. 2011. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35(1): 3-15.
- Feder J H., Rossi J M., Solomon J., Solomon N., Lindquist S. 1992. The consequences of expressing HSP70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes & Development*. 6(8): 1402-1413.



- Ferreira R., Neuparth M J., Ascensão A., Magalhães J., Duarte J., Amado F. 2004. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. *Revista Portuguesa de Ciência do Desporto*. 4(3): 94-111.
- Fuller K J., Issels R D., Slosman D O., Guillet J G., Soussi T., Polla B S. 1994. Cancer and the heat shock response. *European Journal of Cancer*. 30(12): 1884-1891.
- Gotoh T., Terada K., Oyadomari S., Mori M. 2004. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death & Differentiation*. 11(4): 390-402.
- Gupta S C., Siddique H R., Mathur N., Vishwakarma A L., Mishra R K., Saxena D K., Chowdhuri D K. 2007. Induction of Hsp70, alteration in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: modulation by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1770(9): 1382-1394.
- Han Z., Truong Q A., Park S., Breslow J L. 2003. Two Hsp70 family members expressed in atherosclerotic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(3): 1256-1261.
- Hartl D L. & Clark A G. 2007. *Principles of population genetics*. 4<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, p.565.
- Hu G., Tang J., Zhang B., Lin Y., Hanai J., Galloway J., Bedell V., Bahary N., Han Z., Ramchandran R., Thisse B., Thisse C., Zon L., Sukhatme V P. 2006. A novel endothelial-specific heat shock protein HspA12B is required in both zebrafish development and endothelial functions in vitro. *Journal of cell Science*. 119: 4117-4126.
- Hubl S T., Owens J C., Nelson H C M. 1994. Mutational analysis of the DNA-binding domain of yeast heat shock transcription factor. *Nature structural Biology*. 1(9): 615-620.
- Jaattela M. 1995. Over-expression of HSP70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *International Journal of Cancer*. 60(5): 689-693.
- Jiang J., Maes E G., Taylor A B., Wang L., Hinck A P., Lafer A M., Sousa R. 2007. Structural Basis of J Cochaperone Binding and Regulation of Hsp70. *Molecular Cellular Biology*. 28(3): 422-433.
- Kabani M. & Martineau C N. 2008. Multiple Hsp70 isoforms in the eukaryotic cytosol: Mere redundancy or functional specificity? *Current Genomics*. 9: 338-348.
- Kampinga H H. & Craig E.A. 2010. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews*. 11(8): 579-592.
- Karp G. 2005. *Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos*. 3<sup>a</sup> Ed. Editora Manole, São Paulo, p.832.
- Kregel K. 2002. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*. 92(5): 2177-86.
- Lindquist S. & Craig E A. 1988. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*. 22: 631-677.
- Luz H K M., Wanderley L S., Faustino L R., Silva C M G., Figueiredo J R., Rodrigues A P R. 2011. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*. 39( 2): pub. 956.
- Mariani M L., Souto M., Fanelli M A., Ciocca D R. 2000. Constitutive expression of heat shock proteins Hsp25 and Hsp70 in the rat oviduct during neonatal development, the oestrus cycle and early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 120(2): 217-223.
- Matwee C., Kamaruddin M., Betts D H., Basrur P K., King W A. 2001. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. *Molecular Human Reproduction*. 7(9): 829-837.
- Meyer M P. & Bukau B. 2005 Hsp70 Chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62(6): 670-684.
- Monzo C., Haouzi D., Roman K., Assou S., Dechaud H., Hamamah S. 2012. Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Human Reproduction*. 27(7): 2160-2168.
- Mosser D D. & Morimoto R I. 2004 Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*. 23: 2907-2918.

- Mosser D D., Caron A W., Bourget L., Denis-Larose C., Massie B. 1997. Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*.17: 5317-5327.
- Mukhopadhyay I., Saxena D K., Chowdhuri D K. 2003. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (Hsp70-lacZ). *Environmental Health Perspectives*. 111(16): 1926-1932.
- Neuer A., Spandorfer S D., Giraldo P., Dieterle S., Rosenwaks Z., Witkin S S. 2000. The role of heat shock proteins in reproduction. *Human Reproduction Updat*. 6(2): 149-159.
- Nieto-Sotelo J., Wiederrecht G., Okuda A., Parker C S. 1990. The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under non shock condition. *Cell*. 62(4): 807-817.
- Ogata T., Oishi Y., Higashida K., Higuchi M., Muraoka I. 2009. Prolonged exercise training induces long-term enhancement of HSP70 expression in rat plantaris muscle. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 296(5): 1557-1563.
- Ran Q., Wadhwa R., Kawaki R., Kaul S C., Sifers R N., Bick R J., Smith J R., Pereira-Smith O M. 2000. Extra-mitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 275(1): 174-179.
- Ritossa F M. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*.18: 571-573.
- Santoro M.G. 2000. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*. 59(1): 55-63.
- Simon M M., Reikerstorfer A., Schwarz A., Krone C., Luger T A. 1995. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *The Journal of Clinical Investigation*. 95(3): 926-933.
- Somero G N. 1995. Protein and temperature. *Annual Review Physiology*. 57: 43-68.
- Stinshoff H., Brüning K., Hanstedt A., Müller D., Wilkening S., Wrenzycki C. 2009. Effect of different cryopreservation methods on the quality of in vitro produced bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 22(1): 217-217.
- Sung D., Vierling E., Guy C. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis hsp70 gene family. *Plant Physiology*. 126: 789-800.
- Taruthum B., Saikhun K., Sangsuwan P., Kitiyanant Y. 2010. Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8: pub.70.
- Tirelli M., Basini G., Grasselli F., Bianco F., Tamanini C. 2005. Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. *Domestic Animal Endocrinology*. 28(1) 17-33.
- Tissiere A., Mitchell H K., Trancy U. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosomal puffs. *Journal of Molecular Biology*. 84(3): 389-398.
- Torres F A G. & Bonner J J. 1995 Genetic identification of the site of DNA contact in the yeast heat shock transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*. 15(9): 5063-5070.
- Tournier C., Hess P., Yang D D., Xuj., Turner T K., Nimnual A., Bar-Sagi D., Jones S N., Flavell R A., Davis R J. 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*. 288 (5467): 870-874.
- Vos M J., Hageman J., Carra S., Kampinga H H. 2008. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry*. 47(27): 7001-7011.
- Wadhwa R., Kaul S C., Ikawa Y., Sugimoto Y. 1993. Identification of a novel member of mouse hsp70 family. Its association with cellular mortal phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 6615-6621.
- Wadhwa R., Taira K., Kaul S C. 2002 Mortalin: a potential candidate for biotechnology and biomedicine. *Cellular and molecular biology – histology and histopathology*. 17(4): 1173-1177.
- Welch W J. 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiology Review*. 72: 1063-1081.

Wisniewska M., Karlberg T., Lehtiö L., Johansson I., Kotenyova T., Moche M., Schüler H. 2010. Crystal Structures of the ATPase Domains of Four Human Hsp70 Isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS ONE*. 5(1): 8625.

Wyatt S., Mailhos C., Latchman D S. 1996. Trigeminal ganglion neurons are protected by the heat shock proteins HSP70 and HSP90 from thermal stress but not from programmed cell death following nerve growth factor withdrawal. *Brain Research Molecular*. 39(1-2): 52-56.

Wynn R M., Davie J R., Cox R P., Chuang D T. 1994. Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 24(1): 31-36.

Yang J., Liu X., Bhalla K., Kin C N., Ibrado A M., Cai J., Peng T., Jones D P., Wang X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 275: 1129–1132.

Yi X., Luk J M., Lee N P., Peng J., Leng X., Guan X Y., Lau G K., Beretta L., Fan S T. 2008. Association of Mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence. *Molecular & cellular proteomics*. 7(2): 315-325.