

## PROTEÍNAS DEL CHOQUE TÉRMICO Y CARABINAS MOLECULARES

MARÍA CASCALES ANGOSTO

### INTRODUCCIÓN

Los seres vivos, a lo largo de la evolución han desarrollado complejos mecanismos para detectar y responder a una amplia variedad de situaciones ambientales adversas. Esta capacidad de detección y respuesta se asocia muchas veces con la adquisición de una mayor aptitud para tolerar agresiones en muchos casos letales, permitiendo así la supervivencia. Es mucho el interés que despierta este tema entre los investigadores, ya que cualquier alteración en las vías que conducen a la respuesta al estrés es causa de enfermedades, entre las que cabe destacar, la artritis reumatoide, la isquemia, la infección, enfermedades autoinmunes y el cáncer.

Las células responden a las agresiones ambientales sintetizando una serie de sistemas de defensa entre los que se encuentra un grupo específico de proteínas conservadas a través de la evolución, denominadas *proteínas del choque térmico* o *proteínas del estrés (HSP)*. Esta respuesta adaptativa, protege a la célula de gran variedad de agentes potencialmente letales, entre los que se incluye la hipertermia, los oxidantes y la inflamación. Se utilizan los términos «proteínas del choque térmico» y «respuesta al choque térmico» debido a que fue la hipertermia la primera situación de estrés descrita. Los términos alternativos para su denominación y la de las proteínas asociadas con ella son «respuesta al estrés» y «proteínas del estrés», respectivamente (1,2).

La mayoría de estas proteínas se expresan de forma constitutiva en células normales donde juegan un papel fundamental en una serie de procesos biológicos importantes. La mayor parte de las proteínas del estrés constitutivas, funcionan como *carabinas moleculares*, facilitando diversos aspectos celulares del plegamiento, la maduración, el transporte y la degradación de las proteínas. En condiciones, tanto normales como patológicas, estas carabinas se expresan en mayor grado para hacer frente a elevadas concentraciones de proteínas alteradas y son capaces de estabilizar temporalmente a proteínas no plegadas o parcialmente plegadas, previniendo así, interacciones inapropiadas inter e intramoleculares. Disminuyen también la concentración de intermediarios no plegados adecuadamente, sensibles a la agregación, y de esta manera evitan, tanto *in vivo* como *in vitro*, los procesos patológicos de la agregación (3). Las proteínas de respuesta al estrés juegan asimismo, un importante papel en fenómenos relevantes

en el aspecto clínico, entre los que se incluyen enfermedades degenerativas, oncogénesis, traumatismos de órganos y tejidos y la respuesta inmune.

## GENES DEL ESTRÉS Y DE LA SUPERVIVENCIA

Cuando la primera célula surgió en la superficie de nuestro Planeta, hace unos tres mil millones de años, se enfrentó a un ambiente hostil. Tuvo que sufrir largos y amplios cambios para llegar a convertirse en una forma capaz de superar tales hostilidades. Para conseguir esta adaptación una serie de cambios bioquímicos condujeron a modificaciones en la organización genómica. El resultado fue la evolución hacia formas de vida más organizadas, de manera que, partiendo de las primeras bacterias fotosintéticas fueron surgiendo algas cianofíceas, bacterias aerobias, células eucariotas, organismos multicelulares invertebrados, plantas terrestres, peces, aves y animales, hasta llegar al hombre.

En esta secuencia evolutiva, más del 99% de los organismos, al no superar la presión agresiva del medio, sucumbieron sin dejar descendientes y sólo lograron sobrevivir los mejor equipados, como resultado de los cambios introducidos en su genoma. Así, se seleccionaron aquellos que habían logrado adaptarse a las condiciones adversas, debido a la evolución de los *genes de respuesta al estrés*, considerados hoy como las secuencias genómicas más conservadas y abundantes que existen en la Naturaleza. Los mecanismos inherentes de resistencia al estrés, codificados por los genes de respuesta al estrés, son una muestra de las *ganancias evolutivas*.

Para comprender el funcionamiento de estos mecanismos de respuesta es necesario profundizar en la organización del DNA. Una serie de tramos de la secuencia genómica permanecen todavía confusos y sus funciones no están claras. Dada nuestra incapacidad para comprender las propiedades de la mayoría de esas secuencias, se las ha denominado incorrectamente «basura»; pero la Naturaleza no ha creado nada sin un significado. Existen ejemplos en los que se describe que alguna porción del genoma «basura» es a veces operativa. Normalmente permanece en forma durmiente que se activa en determinadas circunstancias. La superfamilia de genes del estrés es posible que pudiera formar parte de esta región de DNA, tan poco conocida hasta el momento. El dogma evolutivo de «*supervivencia del mejor dotado*» se apoya en la capacidad de perpetuar los genes de respuesta al estrés y los genes de resistencia al estrés (4).

La exposición de las células a situaciones de estrés fisiológico o ambiental conduce a una alteración en el metabolismo de las proteínas, ya que ello supone un desafío para que la célula responda con rapidez y precisión al efecto agresivo del estrés sobre la homeostasis celular. Se ha establecido que unas HSP son constitutivas, mientras que otras se expresan bajo la influencia de estímulos diversos entre los cuales se encuentran los siguientes:

- 1) *Fenómenos fisiológicos normales*: progresión del ciclo celular, desarrollo embrionario, diferenciación celular y estímulo hormonal.
- 2) *Estado fisiopatológico*: infección por virus y bacterias, inflamación, respuesta inmune, lesión oxidativa, hipertrofia, isquemia, envejecimiento, cáncer, etc.

- 3) *Situaciones de estrés medioambiental*: elevación de la temperatura, inhibidores del metabolismo energético, metales pesados de transición, análogos de aminoácidos, fármacos hepatotóxicos, etc. (Figura 1) (5, 6)

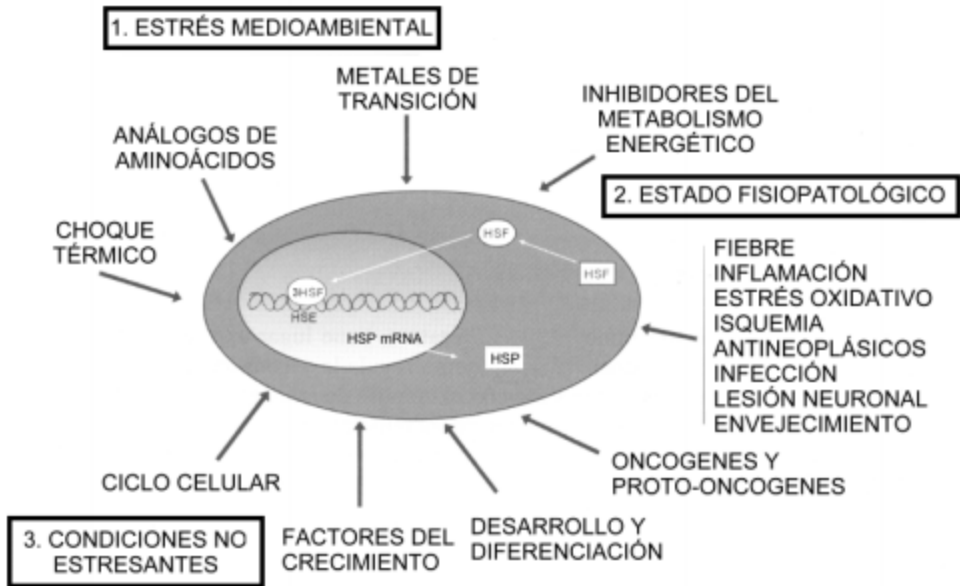


FIGURA 1. *Inductores de la respuesta celular al estrés. Activación del HSF en respuesta a estrés ambiental o patológico, que resulta en elevar la expresión de las HSP [40]. Representación de las tres situaciones que inducen la expresión de proteínas del estrés: (1) estrés fisiológico/ambiental; (2) estados fisiopatológicos; y (3) condiciones no estresantes tales como crecimiento celular y desarrollo. La activación de HSF le permite entrar en el núcleo trimerizarse y unirse al DNA en la región HSE en el promotor de los genes de respuesta al estrés (Morimoto, Sarge y Abravaya 1992) (5).*

Las proteínas del estrés, por tanto, desempeñan una función activa en la defensa celular, aunque intervienen también en gran número de procesos biológicos fundamentales. La mayoría de estas proteínas poseen la capacidad de unirse de manera transitoria a otras proteínas celulares durante su síntesis, transporte y degradación. Debido a su abundancia estas proteínas se encuentran en posición privilegiada para influir en muchos procesos celulares y de ahí su importancia y posible uso como agentes de diagnóstico y terapéutica.

## INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS

La inducción de la respuesta al estrés es un fenómeno extraordinario, tanto por su rapidez en iniciarse, como por la sensibilidad de su atenuación. Esta respuesta, caracterizada por una mayor expresión génica de las proteínas del estrés, se induce por exposición de las células y tejidos a condiciones extremas agudas o crónicas. La función principal de muchas de estas proteínas es la de regular la homeostasis celular y promover la supervivencia. En caso de agresiones demasiado severas, se activa una

señal que conduce a la muerte por apoptosis. De este modo, la célula posee un equilibrio estricto entre supervivencia y muerte

La activación transcripcional de los genes, que conduce a la síntesis de las proteínas del estrés, está regulada por una familia de factores de transcripción (HSF), que responden a estímulos externos. Estos factores son proteínas transreguladoras que requieren, una vez activadas, trasladarse al núcleo donde reconocen a un elemento modulador en la cadena del DNA (HSE). En células normales en estado de reposo, el factor se mantiene en el citosol en forma de monómero, y en respuesta a cualquier estímulo agresivo, se traslada al núcleo donde oligomeriza. Con la oligomerización (formación de trímero), el factor adquiere la capacidad de unirse a una secuencia de nucleótidos en la molécula de DNA localizada dentro del elemento promotor de aquellos genes que codifican para las proteínas del estrés (7).

La respuesta al choque térmico es tan rápida que la unión de la forma trimérica del HSF al HSE puede observarse unos minutos después del estímulo estresante. En células de mamíferos y de invertebrados, la activación de los HSF puede resumirse en las siguientes etapas:

1. Liberación del HSF del complejo con HSP70;
2. Traslado al núcleo;
3. Oligomerización;
4. Unión al HSE;
5. Incremento de la actividad transcripcional (figura 2).

¿De qué manera perciben las células un cambio en el ambiente y activan estos factores de transcripción?

La agresión de cualquier tipo origina la desnaturalización de las proteínas y son estas proteínas desnaturalizadas la señal inicial que desencadena la respuesta al estrés. Kauzmann en 1959 (10) definió la desnaturalización de las proteínas como «una secuencia de procesos en los que la disposición espacial de las cadenas de polipéptidos, experimenta un cambio, desde la configuración típica de la proteína nativa a una disposición desordenada». Posteriormente Kushner (11) propuso que «la desnaturalización es una alteración conformacional de una macromolécula biológica que ocasiona la pérdida reversible o irreversible de su capacidad para llevar a cabo una cierta función». Para la mayoría de proteínas se ha demostrado que el cambio conformacional asociado a la desnaturalización es de primer orden (todo o nada), desde el estado nativo de baja entropía al estado desplegado de alta entropía que se aproxima, dependiendo de las condiciones de desnaturalización, bien a una espiral arbitraria o a un glóbulo derretido con gran tendencia a la agregación (12).

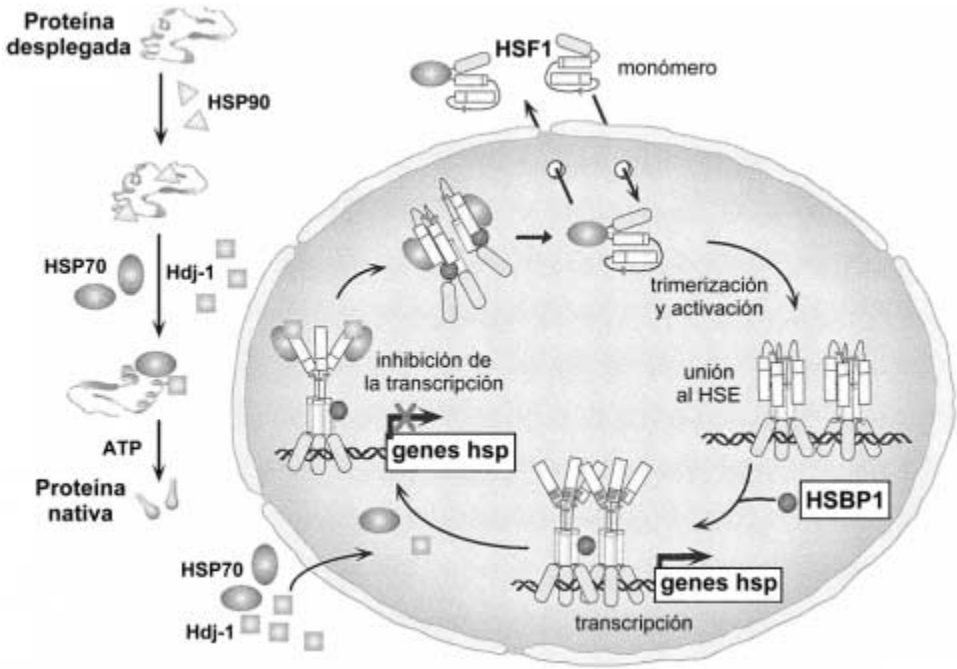


FIGURA 2. Regulación de la respuesta al choque térmico y ciclo del HSF. La activación del HSF1 va unida a la aparición de proteínas no plegadas y al requerimiento celular de la asistencia de las carabinas moleculares HSP90, HSP70 y Hdj, para prevenir la agregación de las proteínas anormalmente plegadas. HSF1 existe en estado normal en el citoplasma o en el núcleo como monómero inerte, en el que su capacidad de unión al DNA y su actividad transcripcional se encuentra bloqueada mediante interacciones transitorias con las HSP90 y HSP70. La activación del HSF1 se asocia con un proceso multiescalonado en el que se incluye su oligomerización con formación de trímero, la adquisición de un estado competente de unión al DNA transcripcionalmente inerte, fosforilación inducible por estrés que se asocia con la actividad transcripcional y transcripción inducible de los genes *hs*. Durante la atenuación de la respuesta al choque térmico, la actividad transcripcional del HSF1 se reprime por unión directa al HSP70 y al Hdj1, y los trímeros se regulan negativamente por la proteína de enlace al HSF (HSBP1 heat shock factor binding protein 1), que se une al dominio hidrofóbico y por el HSP70 que se une al dominio activo. Esta secuencia de eventos conduce a la disociación de los trímeros HSF1 y a la aparición de monómeros HSF1 inertes (Santoro 2000; Jolly y Morimoto 2000) (8, 9).

### Termotolerancia adquirida

El desarrollo de una resistencia transitoria al choque térmico citotóxico fue descrito por primera vez por Gerner y Schneider en 1975 (13). Ya se ha comentado anteriormente que la respuesta al estrés representa un programa universalmente conservado de defensa celular. Quizás el ejemplo mejor conocido de cómo la respuesta al estrés proporciona una mayor protección celular, lo ilustra el fenómeno de la *termotolerancia adquirida*. Este fenómeno se puede detectar en la mayor parte de las células sometidas a un tratamiento térmico subletal, las cuales adquieren resistencia a un posterior incremento de temperatura letal. La termotolerancia adquirida es generalmente transitoria, perdura unas 24 horas en células en cultivo y depende de una serie de cambios indu-

cidos por el tratamiento térmico inicial. Entre estos cambios se incluye, como el más importante, la mayor expresión y acumulación de las HSP. Es un hecho conocido que, un agente o tratamiento que ocasione la inducción de la expresión de los genes del estrés confiere protección a la célula frente a posteriores exposiciones a agentes estresantes no relacionados con el anterior.

Fue a principios de los años sesenta del pasado siglo, cuando Ferruccio Ritossa (14) encontró unos abultamientos en los cromosomas politénicos gigantes de las glándulas salivales de la mosca de la fruta *Drosophila*, después de que la mosca fuera expuesta a unos grados por encima de la temperatura normal. Doce años después el grupo de Tissieres (15) observó que los abultamientos cromosómicos se debían a la mayor expresión de una serie de genes. Estos abultamientos son sitios donde tiene lugar la transcripción de los genes del estrés y los RNA mensajeros que van a dirigir la síntesis de las proteínas en el ribosoma.

A partir de estas primeras observaciones, se han realizado muchos estudios sobre la respuesta al estrés térmico en toda clase de organismos, y es mucho lo que se ha progresado desde la observación de los abultamientos cromosómicos por Rittosa, hasta la caracterización bioquímica de muchas de estas proteínas. Las células que han adquirido termotolerancia por tratamiento térmico están protegidas también frente a otros estímulos diferentes al calor, tales como luz UV y estrés oxidativo.

Para definir la relación entre estrés oxidativo y la inducción de los genes del estrés, se ha investigado en nuestro laboratorio el efecto de la ciclosporina, fármaco inmunodepresor hepatotóxico, sobre la concentración intracelular de la proteína del estrés HSP70 (16). Cuando hepatocitos de rata se incubaron en presencia de ciclosporina, la inducción de la expresión de la HSP70 fue paralela a la producción de peróxidos y a la citotoxicidad. La adición de vitamina E produjo un descenso en los peróxidos, en los parámetros de citotoxicidad y en la expresión de la HSP70. La interacción entre la HSP70, proteína endógena inducida en respuesta al estrés oxidativo, y la vitamina E, un antioxidante exógeno, puede considerarse competitiva por las especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, la vitamina E produjo un cambio en el modo de muerte celular, desde la agresiva necrosis hacia la apoptosis, y este cambio, ventajoso para las células remanentes, es una consecuencia de la desaparición de las proteínas del estrés. Con el objeto de comprobar si el efecto inhibitorio de la apoptosis de la proteína del estrés HSP70 podía contrarrestar el efecto apoptogénico clásico del factor de crecimiento transformante alfa, otros experimentos de nuestro grupo han demostrado que la hipertermia, aplicada a hepatocitos de rata, elevó la resistencia de estas células a la apoptosis inducida por el factor transformante, resistencia que estuvo acompañada por mayor expresión de la proteína HSP70 y de los sistemas antioxidantes endógenos y una disminución de los niveles de especies reactivas de oxígeno.

Estos datos obtenidos en nuestro laboratorio, abren un horizonte de máximo significado fisiopatológico. Por un lado, la vitamina E al cambiar el modo de muerte celular desde necrosis a apoptosis protege a las células de las consecuencias inflamatorias de la necrosis. Sin embargo, esta vitamina al inhibir la expresión de las proteínas del estrés puede eliminar un mecanismo protector importante que es la resistencia a la apoptosis (18, 19)

## CARABINAS MOLECULARES

En la actualidad es un hecho bien conocido que las proteínas recién sintetizadas en el interior de las células necesitan la asistencia de otras proteínas para lograr llegar a formar complejos oligoméricos funcionales. Se conoce hasta la fecha un número de diferentes carabinas moleculares, varias de las cuales cooperan en la producción de proteínas maduras. Una de ellas, la HSP70 y otras carabinas asociadas, participan en numerosos procesos esenciales para la supervivencia celular en condiciones, tanto normales como patológicas (19). Ayudan al plegamiento de las cadenas polipeptídicas y a su traslocación a través de las membranas, intervienen en la unión y desunión de los complejos proteicos, en la presentación de sustratos para su degradación y en la supresión de la agregación proteica. Tal versatilidad es asombrosa para una maquinaria proteica compuesta de tan pocos elementos. La importancia de las HSP70 está recalada por su conservación evolutiva.

Hace casi 30 años se demostró (20) que las cadenas polipeptídicas pueden plegarse espontáneamente para formar las estructuras compactas de las proteínas nativas funcionales, cuya conformación tridimensional está determinada por su estructura primaria. A este principio fundamental de la biología ha habido que añadirle un detalle importante, y es que para conseguir la conformación tridimensional adecuada se necesita la asistencia de otras proteínas que ayuden al plegamiento e impidan la agregación. En el interior de la célula, las condiciones de elevada concentración proteica, temperatura y fuerza iónica, son muy desfavorables para el correcto plegamiento proteico. Por eso, se necesita la ayuda de unas proteínas auxiliadoras o *carabinas moleculares*. Las carabinas moleculares son proteínas, abundantes y ubicuas, cuyas características comunes son la interacción con subunidades de proteínas no nativas, la estabilización de los intermediarios del plegamiento proteico y la prevención de la agregación. Estas actividades aumentan el rendimiento del plegamiento y ayudan a la recuperación celular después de una agresión. También conducen al desdoblamiento de las proteínas alteradas irreversiblemente en un proceso encaminado hacia su degradación.

El término *carabinas moleculares* (*en inglés, molecular chaperones*) fue usado por primera vez por Laskey (21) para describir la función de la nucleoplasmina en el ensamblaje del DNA y las histonas para formar los nucleosomas. El nombre parecía apropiado porque la nucleoplasmina facilita la interacción entre histonas para dar lugar a la forma oligomérica correcta que impida la agregación.

Según Ellis, de la Universidad de Warwick del Reino Unido (22), carabina es un término usado en lenguaje vulgar para describir una forma particular bastante anticuada de comportamiento social de los seres humanos: «mujer de edad que acompaña a las jóvenes como guía y protección». «De esta manera, continúa Ellis, el papel tradicional de la carabina humana, si se describe en términos bioquímicos, es el de prevenir interacciones impropias entre superficies potencialmente complementarias». El término carabina molecular es, por tanto, el apropiado en idioma español para describir aquellas proteínas que impiden interacciones incorrectas entre partes de otras moléculas, pero que no proporcionan información estérica ni forman parte de las estructuras funcionales finales (23).



## PLEGAMIENTO ASISTIDO DE LAS PROTEÍNAS

La vida de las proteínas, desde la biosíntesis del polipéptido naciente, hasta conseguir su estructura funcional nativa en un lugar específico de la célula, está sometida a muchos peligros. Si los polipéptidos no están protegidos, son propensos a la agregación o a la degradación rápida. Para prevenir estos acontecimientos no deseados, ha surgido una serie de sistemas complejos de protección, desde las bacterias hasta los humanos, que se encarga del plegamiento y del transporte de los polipéptidos recientemente sintetizados y de las proteínas funcionales, si una vez que han adquirido su conformación nativa, sufren algún desdoblamiento eventual por efecto de agresiones ambientales. El concepto de control de la lesión, así como el de control de calidad de las proteínas y los sistemas encargados de ese control, surge al identificarse las proteínas del estrés y las carabinas moleculares.

El plegamiento de las proteínas es un proceso mediante el cual la información lineal contenida en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, da lugar a la conformación tridimensional bien definida de la proteína funcional. La manera en que este plegamiento se realiza en el interior de la célula constituye un problema central en biología. Como las proteínas en su estado desplegado pueden alcanzar espontáneamente *in vitro* su estado nativo funcional, se asumió que el plegamiento o adquisición de la estructura terciaria, y la formación de oligómeros proteicos, a partir de polipéptidos recién sintetizados, también ocurriría espontáneamente *in vivo*, sin intervención de enzimas y sin el consumo de energía metabólica. Este punto de vista mantenido durante muchos años, se ha revisado recientemente y se ha llegado al convencimiento que el plegamiento correcto de muchas proteínas, depende del funcionamiento de una maquinaria proteica preexistente, las carabinas moleculares.

Las carabinas moleculares son, por tanto, un grupo de proteínas no relacionadas, que median el correcto ensamblaje de otras proteínas, pero no son ellas mismas componentes de las estructuras funcionales finales. Se encuentran ampliamente distribuidas y muchas de ellas se clasifican entre las proteínas del estrés, aunque también presentan funciones esenciales en condiciones normales. Las carabinas moleculares se unen y estabilizan la conformación inestable de otra proteína y mediante uniones y liberaciones controladas, facilitan *in vivo* su destino correcto. Este destino comprende las siguientes etapas:

1. Plegamiento,
2. Ensamblaje oligomérico,
3. Transporte a un compartimento subcelular específico, y/o
4. Degradación.

Las carabinas moleculares no contienen información estérica que especifique el plegamiento correcto. En vez de ello, impiden las interacciones incorrectas dentro y entre los polipéptidos, incrementando así el rendimiento, pero no la velocidad, de las reacciones de plegamiento. Esto las distingue de las foldasas, tales como las proteína disulfuro isomerasas y las peptidil-prolil isomerasas. Estos enzimas aceleran intrínsecamente las etapas lentas en el plegamiento de algunas proteínas, como la reorganiza-



ción de los enlaces disulfuro en las proteínas secretoras y la isomerización cis-trans de los enlaces peptídicos que preceden los residuos de prolina, respectivamente.

Las carabinas moleculares intervienen también en la formación de complejos oligoméricos y en el desdoblamiento parcial y disociación de subunidades, cuando algunas proteínas han finalizado sus funciones y tienen que ser degradadas. Algunas carabinas moleculares actúan como proteínas del estrés, porque el requerimiento celular de la función de las carabinas se eleva en condiciones que causan el desdoblamiento y la agregación de las proteínas. Por el contrario, algunas proteínas del estrés son carabinas moleculares. Por tanto, la respuesta al estrés ha de considerarse en muchos aspectos como una amplificación de la función básica de las carabinas, que todas las células necesitan en condiciones normales, frente a la función única de las proteínas del estrés requerida sólo en condiciones agresivas.

Para que una proteína sea considerada una carabina molecular, tiene que cumplir las dos condiciones siguientes:

- a) asistir al plegamiento o desdoblamiento de estructuras proteicas, y
- b) no formar parte de estas estructuras proteicas cuando estén realizando su función biológica.

Las carabinas moleculares se encuentran en todo tipo de células y se ha especulado que son necesariamente promiscuas, debido a que pueden asistir al plegamiento de muchas cadenas polipeptídicas diferentes.

La función más importante de las carabinas moleculares no es la de proporcionar información estérica esencial para que algunas proteínas se plieguen y asocien correctamente, sino más bien es la de prevenir o revertir procesos de agregación que se originan en el medio intracelular con elevadas concentraciones de macromoléculas. En otras palabras, la existencia de las carabinas moleculares no pone en duda la validez de la idea de que la información estérica de las proteínas, para plegarse y asociarse adecuadamente, reside en su estructura primaria. Sin embargo, esta auto-asociación necesita de una asistencia para operar eficientemente en las condiciones de elevadas concentraciones de macromoléculas, características del medio intracelular

## Breve historia

El estudio pionero de Anfinsen y Harber en 1961 (24), sobre la renaturalización *in vitro* de la ribonucleasa pancreática bovina a su forma de enzima nativa biológicamente activa, demostró que la generación de la conformación nativa de una proteína purificada, puede verificarse espontáneamente en un tubo de ensayo sin adición de ningún otro cofactor o enzima auxiliar. Esto condujo a la conclusión, que «no se requiere información genética especial, más allá de la contenida en la secuencia de aminoácidos, para el plegamiento propio de la molécula y para la formación correcta de los puentes disulfuro».

Esta y otras primitivas investigaciones demostraron que los procesos llevados a cabo *in vitro*, podían reconstituir estructuras proteicas nativas funcionales. Sin embar-

go, estas reconstituciones se verificaban de forma muy lenta. Por ejemplo, en condiciones óptimas de dilución proteica, pH y temperatura, la renaturalización de la RNasa, proteína monomérica relativamente simple, necesitaba unos 20 minutos (113). La renaturalización *in vitro* de proteínas poseedoras de multidominios podía durar varias horas, y está claro que todas las conformaciones posibles no podían ser aprobadas como estructuras nativas. Levinthal (25) resumió este fenómeno en la denominada «paradoja de Levinthal» que puede expresarse como sigue: *si un aminoácido dado puede adoptar unas 10 conformaciones diferentes, el número total de conformaciones totales en una proteína de 100 aminoácidos sería de  $10^{100}$* . Dependiendo del número de conformaciones posibles que puede adoptar una proteína antes de alcanzar el estado nativo, el tiempo necesario para completar estas estructuras superaría el período vital de un organismo. Desde entonces se empezó a pensar que las células debían poseer mecanismos especiales que elevaran la eficiencia de estos procesos, y posteriormente se demostró que los polipéptidos simples monoméricos podían fácilmente renaturalizar su estructura proteica por sí mismos, mientras que otras proteínas más complejas, con multidominios u oligoméricas, se plegaban y ensamblaban eficientemente en presencia de otras proteínas no constituyentes de la propia proteína nativa.

El papel del medio intracelular en el plegamiento proteico implicaban la *renaturalización* de proteínas tales como la RNasa, el inhibidor de la tripsina pancreática bovina o la hemaglutinina de la gripe, en fracciones de microsomas aislados. Esto indica que el plegamiento puede estar facilitado por proteínas ubicadas en el retículo endoplásmico de las células eucariotas. Los polipéptidos simples monoméricos pueden fácilmente renaturalizar su estructura proteica por sí mismos, mientras que otras proteínas más complejas, con multidominios u oligoméricas, se pliegan y ensamblaban eficientemente sólo en presencia de proteínas adicionales, no constituyentes de la propia proteína nativa.

Aunque el término carabinas moleculares fue acuñado por Laskey para describir la función especializada de la nucleoplasmina en el ensamblaje de la cromatina, nuestro conocimiento actual del papel de estas carabinas sobre el plegamiento proteico emergió a partir de las investigaciones sobre la HSP70 y la HSP60. Sobre la base de su sorprendente inducibilidad por calor, se propuso que la HSP70 ayudaba a la reparación o degradación de los polipéptidos que se desnaturalizaban por estrés térmico. También se indicó que la HSP70 jugaba un papel igualmente importante en la estabilización del plegamiento y ensamblaje de los intermediarios de los polipéptidos sintetizados recientemente, en condiciones fisiológicas normales. El homólogo de la HSP70 en el lumen del retículo endoplásmico, la proteína BiP, se encontró formando un complejo con las cadenas pesadas de la inmunoglobulina y otras proteínas secretoras. La HSP70 de mamíferos interacciona con una gran fracción de cadenas de polipéptidos nacientes en el citosol sobre la base de su capacidad de unirse a los segmentos peptídicos hidrofóbicos de una manera dependiente del ATP (26).

Sólo se ha estudiado en detalle el plegamiento intracelular de unas pocas proteínas. Entre ellas está la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica humana (hCG- $\beta$ ), cuya cinética de plegamiento se muestran en el diagrama de la figura 3 (23)

Existe cada vez más interés en investigar los mecanismos que regulan el plegamiento *in vivo* de las proteínas, debido al número de enfermedades humanas conocidas que se relacionan con defectos en este plegamiento. Estas incluyen la fibrosis quística,

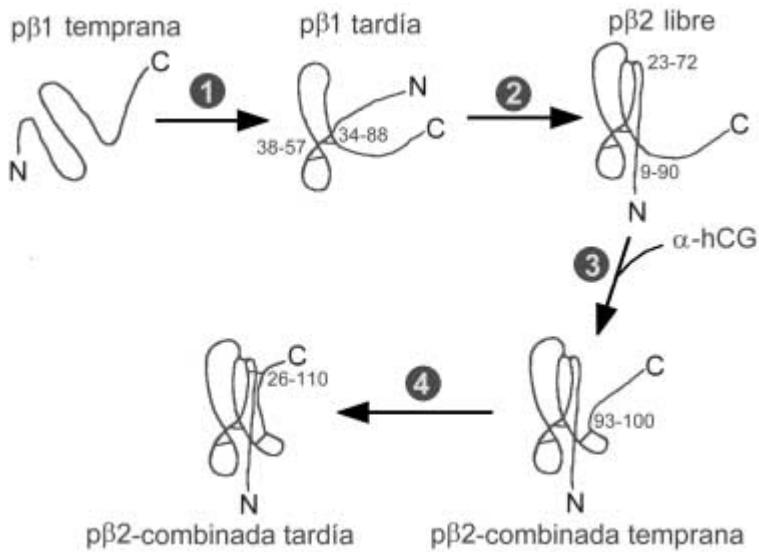


FIGURA 3. Modelo del mecanismo de plegamiento de la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica humana ( $hCG-\beta$ ). Estudios cinéticos intracelulares han indicado que la  $hCG-\beta$  recién sintetizada en el interior de la célula (proteína  $\beta$  temprana), se convierte en un intermedio (proteína  $\beta$  tardía) que posee dos enlaces disulfuro 34-88 y 38-57 ( $t_{1/2} = 2-3$  min). Posteriormente con la formación secuencial de otros dos enlaces disulfuro 9-90 y 23-72 la proteína- $\beta$ -tardía sufre un gran cambio conformacional en proteína- $\beta$ 2-libre ( $t_{1/2} = 4-5$  min). Cuando se forma el puente disulfuro 93-100 la proteína- $\beta$ 2-libre se convierte en un intermedio competente ( $t_{1/2} = 8-10$  min) que después de la asociación con la subunidad  $\alpha$  se reconoce como proteína  $\beta$  combinada. Después del ensamblaje del heterodímero el enlace 26-100 forma un cinturón alrededor de la subunidad  $\alpha$  (Ruddon y Bedows 1997) (23).

la deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeld-Jacob, y enfermedades degenerativas tales como la enfermedad de Huntington y el cáncer.

## REPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ALTERADAS

Un gran grupo de proteínas del choque térmico o proteínas de estrés funcionan como carabinas moleculares en la reparación de las proteínas lesionadas. Entre estas se incluyen las siguientes familias: HSP70, HSP90, HSP104, HSP40 (DnaJ), las pequeñas HSP27, y las  $\alpha$ -cristalinas. Todas se unen selectivamente a las proteínas desnaturadas o a los dominios de polipéptidos parcialmente plegados. La mayoría de estas carabinas son constituyentes celulares importantes en condiciones normales donde su función es esencial para asegurar el plegamiento apropiado y la localización intracelular de los polipéptidos recién sintetizados. Los polipéptidos nacientes emergen del ribosoma, y la mayoría de ellos se asocia con la HSP70 y con otras carabinas como la TCP-1, las cuales facilitan el plegamiento apropiado y protegen interacciones o agregaciones no deseadas. Sin embargo, una fracción de esas proteínas nacientes no consigue adquirir su correcta conformación y tienen que ser rápidamente digeridas. En condiciones adversas que causan una amplia lesión de las proteínas celulares, por ejemplo, en el caso de un choque térmico, la célula necesita ayuda y de manera rápida

se eleva la expresión de estas carabinas como parte de la respuesta al choque térmico, o al estrés.

Las carabinas HSP70 y HSP40 pueden funcionar en un proceso dependiente de energía (ATP) para catalizar el repliegamiento de proteínas desnaturalizadas total o parcialmente y llevarlas a sus formas activas. Una de las funciones más interesantes es la capacidad de ciertas combinaciones de carabinas, en particular HSP70, HSP104 y HSP40 de deshacer los agregados intracelulares proteicos y acelerar el repliegamiento de moléculas insolubles en especies solubles activas.

Otro grupo de proteínas del estrés sirve para proteger las células de las especies activas de oxígeno. Por ejemplo, la superóxido dismutasa, la hemooxigenasa y la catalasa pueden ser inducidas como parte de la respuesta a estrés y ayudan protegiendo a las proteínas, lípidos y DNA del daño oxidativo. Cada uno de estos enzimas, cuando se expresan en mayor grado en animales transgénicos o en células en cultivo, pueden proteger a las células de la lesión producida por isquemia/reperfusión. Uno de los aminoácidos más susceptibles de sufrir el daño oxidativo es la metionina, y muchos tejidos, especialmente el cerebro y la retina, contienen metionina sulfóxido reductasa, enzima que repara específicamente este tipo de alteración proteica. Es interesante destacar que este enzima se encuentra muy disminuido en cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer. La importancia relativa de estos mecanismos protectores depende de la naturaleza de la proteína mutada y de la especificidad del estrés ambiental.

Las funciones de las carabinas moleculares son las siguientes:

1. Prevenir la agregación de proteínas mutantes o lesionadas
2. Catalizar el plegamiento proteico y el ensamblaje de los multímeros
3. Solubilizar los agregados proteicos
4. Promover la ubiquitinación y la degradación de las proteínas anormales no reparables
5. Promover el plegamiento apropiado y la glicosilación de proteínas segregadas y de membrana
6. Suprimir el programa apoptogénico
7. Regular su propia expresión en el citosol y en el retículo endoplásmico (27).

## **DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS**

En los años setenta del pasado siglo, los enzimas proteolíticos se consideraban como un campo de investigación poco interesante, ya que eran poco específicos y la hidrólisis de un enlace peptídico era una reacción favorable termodinámicamente. Aunque alguno de estos enzimas actuaba con sorprendente especificidad, y se conocían entonces reacciones proteolíticas que requerían ATP, la destrucción de las proteínas parecía algo simple comparado con la complejidad de otras vías metabólicas.

La degradación proteica es un mecanismo estrictamente regulado y necesario para el mantenimiento de la homeostasis celular, mediante la reconstrucción continua de las estructuras celulares, durante el desarrollo o en respuesta a estímulos externos. *En primer lugar*, las proteínas que presentan alteraciones en su plegamiento, debidas a mutaciones o a agresiones oxidativas o térmicas, deben ser destruidas, porque dichas proteínas alteradas presentan gran propensión a formar agregados. *En segundo lugar*, la degradación proteica proporciona una vía celular importante para dar por terminada la actividad de proteínas reguladoras, una vez que han finalizado su misión.

A pesar de estas ventajas, la degradación proteica se considera como un arma de dos filos, y para evitar que resulte peligrosa para la célula al destruir masivamente proteínas que pueden aún ser útiles, ha de estar sujeta a un control espacial y temporal. Para controlar la degradación proteica, la célula utiliza una estrategia básica, la compartimentación, la cual consiste en confinar la actividad proteolítica en lugares sólo accesibles a las proteínas que posean en su molécula determinados signos de degradación. Estos lugares pueden ser orgánulos delimitados por una membrana, como es el caso de los lisosomas, donde ingresan mediante vías específicas, las proteínas que van a ser degradadas y donde se traslocan, por medio de vesículas de transporte, las hidrolasas encargadas de realizar la degradación.

Las proteínas celulares se encuentran en continuo proceso de síntesis y degradación, aunque a muy diferente velocidad. Para asegurar que la degradación de las proteínas celulares sea un proceso selectivo, que elimine de manera rápida ciertas proteínas, han surgido una serie de mecanismos enzimáticos estrictamente controlados. Para conseguir esta selectividad, las proteínas que van a ser degradadas tienen que ser «marcadas» por unión covalente a una pequeña carabina de 8 kDa, la ubiquitina. En eucariotas la ubiquitina se une y acompaña a la proteína a degradar hacia el proteosoma, que es donde la proteólisis se verifica.

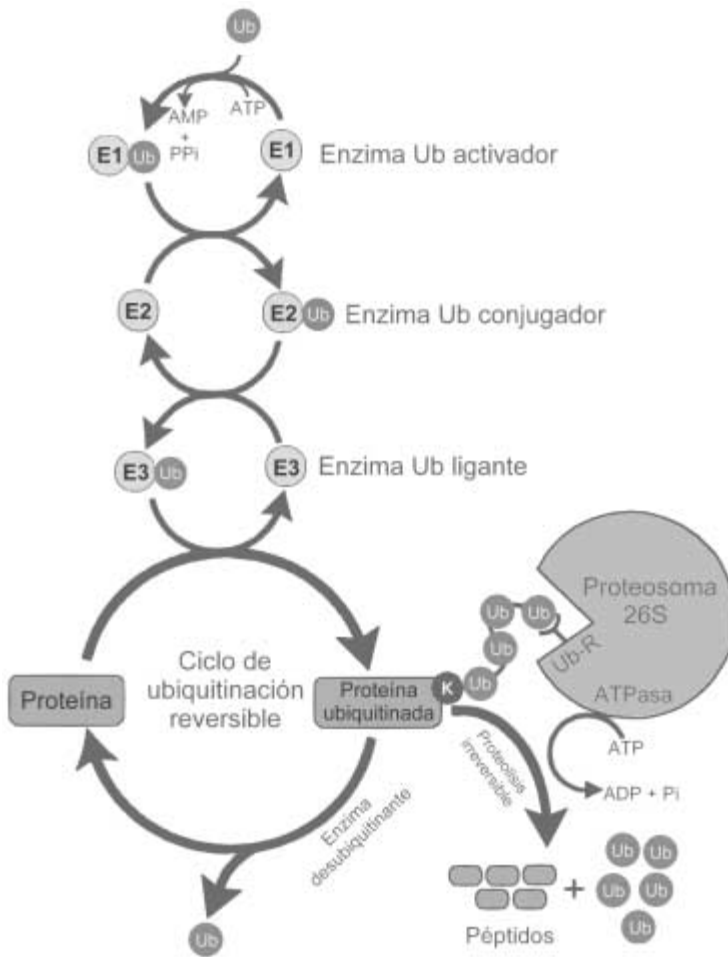
### **Vía de la ubiquitina-proteosoma**

El calor y otras formas de estrés que causan la desnaturalización de las proteínas, inducen la síntesis de las HSP, muchas de las cuales actúan como carabinas moleculares. Una de las funciones principales de estas carabinas moleculares después de ser inducidas por una situación de estrés es la de catalizar el replegamiento de las proteínas desnaturalizadas. Sin embargo, las carabinas moleculares también estimulan la degradación de proteínas y esto surge cuando las carabinas fracasan en su función de asistencia en el correcto plegamiento, ensamblaje o translocación; entonces estas mismas carabinas actúan estimulando y facilitando la degradación de las proteínas alteradas (28).

El proceso de la degradación proteica requiere ATP y ubiquitina. El sistema proteolítico consiste en dos etapas diferenciadas:

1. Reconocimiento por la ubiquitina, de las proteínas a degradar
2. Degradación por el proteosoma de las proteínas ligadas a la ubiquitina.

La vía de la ubiquitina-proteosoma juega un papel clave en diversos procesos biológicos entre los que cabe destacar la proliferación y diferenciación celulares, el



desarrollo y los niveles de proteínas los cuales están determinados por este sistema, de acuerdo con la especificidad del sustrato. Esta vía es el sistema más importante en la célula eucariota para la destrucción selectiva de proteínas reguladoras de vida corta. Una característica común de la degradación proteica mediada por el proteosoma es la inserción covalente de ubiquitina a residuos de lisina de la proteína que se va a degradar, seguido de la formación de cadenas de poliubiquitina. Las proteínas señaladas por la ubiquitina se reconocen y degradan por el complejo multiproteasa proteosoma. La ubiquitinación puede también tener funciones reguladoras como la de dirigir la localización subcelular de las proteínas.

La ubiquitina fue descrita por primera vez por Schlesinger, Goldstein y Niall en 1975 (29) como una proteína de 76 aminoácidos y 8,6 kDa, muy abundante y ampliamente distribuida, de ahí su nombre. Posteriormente el grupo de Hersko (30), la identificó como un componente esencial del sistema proteolítico dependiente de ATP en un extracto de reticulocitos de ratón y descifraron la enzimología de la ubiquitinación. Varshasky (31) tuvo la primera evidencia del requerimiento de la ubiquitina para la degradación proteica, la cual era esencial para la progresión del ciclo celular, presa-

giando el papel que jugaban las ciclinas, cuya destrucción periódica dependiente de la ubiquitina, era la fuerza conductora del ciclo. En 1996, Hershko descubrió la primera señal degradativa del sistema ubiquitina (32).

La unión covalente de la ubiquitina a las proteínas que se van a degradar se realiza mediante un sistema multienzimático consistente en los enzimas siguientes: E1 enzima activador de la ubiquitina (Ub-activador), E2 enzimas conjugadores de la ubiquitina (Ub-conjugador) y E3 proteína-ubiquitina ligasas (Ub-ligasas). E1 activa la ubiquitina de manera dependiente del ATP. La ubiquitina activada forma un enlace tioester entre el carboxilo terminal de un residuo de glicocola de la ubiquitina y un residuo cisteína de E1. Después la ubiquitina se transfiere desde E1 a una de las E2 preservando el enlace energético tioester. En algunos casos la ubiquitina se transfiere directamente desde E2 a la proteína a degradar, mediante un enlace isopéptido entre el grupo ε-amino de un residuo de lisina de la proteína y el carboxi terminal de la ubiquitina. En otros casos, la transferencia de la ubiquitina desde E2 procede mediante la formación de un intermediario catalizado por la proteína-ubiquitina ligasa (E3).

Múltiples residuos de ubiquitina se insertan repetidamente en las proteínas formando una cadena ramificada de ubiquitinas. La especificidad de la ubiquitinación proteica deriva a menudo del enzima E3 y las proteínas poliubiquitinadas por estos enzimas están sujetas a la degradación por el proteosoma de 26S (Figura 13).

El proteosoma es el principal responsable de la degradación de proteínas funcionales que posean una multicadena de ubiquitina como señal de degradación. Sin embargo, se ha demostrado que el proteosoma puede actuar también sobre la ornitina descarboxilasa sin ubiquitinar, cuando esta proteína se asocia con un anti enzima (su proteína inhibidora específica), exponiéndose de esta manera a la señal de degradación.

El proteosoma, como proteasa endoproteolítica, cataliza la hidrólisis exhaustiva de las proteínas funcionando como una máquina destructora de proteínas (protein death machine).

Las proteasas intramitocondriales requieren también el concurso de las carabinas para la proteólisis óptima. Se ha demostrado la participación de carabinas en el transporte selectivo de ciertas proteínas citosólicas hacia el lisosoma, donde han de ser degradadas.

De lo anteriormente expuesto se deduce que, las carabinas se requieren para la degradación de proteínas anormales. En algunos casos su papel es simplemente prevenir la formación de agregados proteicos, lo cual es una de las funciones primarias en el plegamiento y traslocación proteicas. Sin embargo, las evidencias sugieren que las carabinas pueden jugar un papel más específico en la ruptura de proteínas, bien por su asociación con las proteasas, facilitando etapas limitantes en la degradación o promoviendo el transporte selectivo hacia los lisosomas

## **IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LAS CARABINAS MOLECULARES**

En una gran cantidad de enfermedades sistémicas se ha observado un acúmulo de polipéptidos anormalmente plegados formando inclusiones insolubles en el interior de



las células, que juegan un papel crítico en la patogénesis de dichas enfermedades. Son muchas las enfermedades hereditarias causadas por mutaciones que previenen el plegamiento normal de las proteínas. Entre ellas cabe citar la fibrosis quística y la deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina en muchas hemoglobinopatías. En la talasemia, el exceso de cadenas de globina precipita en forma de inclusiones que distorsionan notablemente la forma de los eritrocitos. Características típicas de muchas enfermedades neurológicas, son las inclusiones intracelulares de proteínas desnaturalizadas. Entre estas se incluye, la esclerosis lateral amiotrófica, las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, y diversas enfermedades hereditarias causadas por expansiones de poliglutamina, como la enfermedad de Huntington o las ataxias espinocerebelares.

En todas estas enfermedades neurodegenerativas, la patología y la muerte eventual de poblaciones específicas de neuronas, se deben a la acumulación de polipéptidos anormales. Estos tipos de inclusiones surgen a través de un mecanismo común y provoca respuestas similares. Cuando la capacidad de la célula para degradar o replegar el exceso de polipéptidos anormales es insuficiente, las moléculas desnaturalizadas o parcialmente plegadas se acumulan y tienden a agregarse y a formar inclusiones de gran tamaño que pueden incluso observarse al microscopio óptico. Estas inclusiones se asocian con las carabinas moleculares, con las proteínas ubiquitinadas, con los enzimas que conjugan la ubiquitina, con el proteosoma 26S etc., y forman grandes estructuras denominadas «agresomas» (33).

Es interesante destacar que la formación del agresoma se acelera en presencia de inhibidores del proteosoma, que se adicionaron experimentalmente para bloquear la degradación de los polipéptidos anormales. Posiblemente, la inhibición de la proteólisis por el proteosoma, expone a la célula a un proceso similar al que ocurre, aunque más lentamente, en pacientes durante la progresión de muchas enfermedades degenerativas. El hallazgo de un gran número de proteosomas asociados en estas inclusiones, debe significar que estas estructuras son lugares especializados para la proteólisis, o que los polipéptidos agregados en las inclusiones, resisten la degradación y pueden incluso atrapar estos proteosomas en complejos no funcionales.

En las enfermedades neurodegenerativas antes citadas y en las enfermedades priónicas, las inclusiones implican interacciones proteína-proteína especialmente estables debido a la formación masiva de estructuras beta, que se mantienen unidas por múltiples enlaces de hidrógeno. A pesar de su estabilidad química, estas estructuras, una vez formadas, no son necesariamente componentes celulares permanentes y pueden desaparecer con el tiempo debido a replegamientos o degradación. En cualquier caso, el agresoma puede funcionar como un lugar de almacenaje que protege a la célula, aislándola temporalmente de los polipéptidos desnaturalizados potencialmente lesivos, hasta que ellos puedan ser replegados o digeridos. Esta reversibilidad ofrece una esperanza para estas enfermedades progresivas, siempre que pueda alterarse el equilibrio entre la generación de proteínas anormales y su eliminación.

La pérdida de capacidad para inducir las proteínas del estrés en el envejecimiento, es uno de los factores importantes que determinan la aparición de enfermedades neurodegenerativas en la senectud. Es interesante destacar, que las células que poseen la proteína priónica mutante, tienen disminuida su capacidad de inducir la síntesis de las carabinas, lo cual incrementa la vulnerabilidad a la apoptosis inducida por los priones. También, las mutaciones en la presenilina1, causantes de la enfermedad de Alzheimer

temprana, reducen la capacidad de las neuronas a inducir la expresión de las carabinas moleculares. Sería de esperar que en alguna fase de estas enfermedades se active la respuesta al estrés, frente a la acumulación intracelular de proteínas anormales. Este problema, aún sin resolver, es de importancia apreciable, ya que un tratamiento farmacológico que indujera la expresión de las carabinas podría representar un gran logro para la terapia de estas enfermedades

## **Oncogénesis y Cáncer**

La capacidad de las carabinas moleculares de modular la respuesta al estrés, presenta también implicaciones terapéuticas relacionadas con el cáncer. Muchas células tumorales expresan concentraciones atípicas de carabinas, lo que ha llevado a considerarlas biomarcadores útiles en el diagnóstico del cáncer. Por ejemplo, la expresión de las proteínas del estrés en cáncer mamario o gástrico, se asocia con prognosis pobre y resistencia a la quimioterapia o radioterapia. La elevada expresión de la proteína de multiresistencia, cuyo correspondiente gen contiene un elemento del choque térmico, es la causante del desarrollo de la resistencia a las terapias antineoplásicas (34).

Estas observaciones nos llevan a formular la siguiente pregunta:

¿Cómo se explica que acontecimientos frecuentes como la inducción de la expresión de las proteínas del estrés o la exposición a una situación de estrés, no conduzcan al fenotipo transformado o a un riesgo de transformación?

La respuesta es que la sobreexpresión forzada de las proteínas del estrés puede complementar el fenotipo transformado, pero esta sobreexpresión, por sí misma, es insuficiente para causar la transformación celular. El proceso de transformación celular puede utilizar componentes de respuesta al estrés para alterar la conformación y actividades de proteínas mutantes supresoras de tumores. También, una concentración aberrante de carabinas moleculares puede potenciar la actividad transformadora de oncogenes tales como el p53 mutante, e interferir con el mecanismo señalizador del estrés, perturbando así un mecanismo celular de defensa que conduciría normalmente a la eliminación por apoptosis de las células transformadas.

## **Infección**

La expresión de las carabinas se manifiesta también durante un proceso infeccioso en el que interactúan un agente patógeno y el organismo hospedador. La expresión de los genes del estrés se presenta tanto en el microorganismo como en el organismo invadido. El papel de las carabinas microbianas se ha estudiado intensamente en términos de inmunidad antiinfecciosa y se ha encontrado que funciona como factor de virulencia en algunos microorganismos. Estas moléculas pertenecen también a antígenos inmunodominantes y los anticuerpos frente a las carabinas bacterianas, se encuentran muy elevados en individuos infectados o vacunados. Esto ha hecho que la evaluación de estas proteínas se utilice como un marcador efectivo de la vacunación.

## **Efecto protector de la fiebre**

El efecto protector de la fiebre se ha discutido ampliamente desde Hipócrates. Como la respuesta al estrés se induce por la fiebre, se han demostrado incrementos en la expresión de estas proteínas en condiciones sépticas e inflamatorias. Los efectos citoprotectores de las proteínas del estrés pueden explicar algunos de los efectos beneficiosos de la fiebre. Además, diversos estudios han detectado que la inducción de la respuesta al estrés por pretratamiento térmico, protege del shock endotóxico y de la sepsis. Ha sido interesante observar que la respuesta al estrés por diferentes medios puede modular la respuesta proinflamatoria y de esta manera proteger al organismo.

## **Sistema inmune**

Las proteínas del estrés microbianas son ubicuas y muy inmunogénicas. En humanos sanos, pueden detectarse células T y B con especificidad para las proteínas del estrés propias. En pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas se han observado concentraciones muy elevadas de anticuerpos y células T con reactividad a las propias proteínas del estrés. Sobre la base de éstas o de otras evidencias, la elevada reactividad inmune puede ser resultado de la inducción de las propias proteínas del estrés durante la inflamación, y es posible que sea causada por la destrucción tisular. La inmunización con secuencias conservadas de las proteínas microbianas, eleva la resistencia a la inducción de enfermedad autoinmune. La reactividad dirigida hacia las propias proteínas del estrés, puede ser parte de un mecanismo efector regulador inmune, que contribuye al mantenimiento de la autotolerancia y posee actividad antiinflamatoria. El estímulo de tales mecanismos antiinflamatorios efectores por inmunización artificial, ofrece atractivas posibilidades inmunoterapéuticas

## **CONCLUSIONES**

La mayoría de las proteínas del estrés funcionan como carabinas moleculares, lo que significa que interaccionan transitoriamente con otras proteínas, para guiar su correcto plegamiento y transporte en el interior de la célula, para asistirles en sus funciones fisiológicas o para protegerlas y recuperarlas de las lesiones inducidas por estrés. Estas interacciones abarcan un amplio espectro, desde el nacimiento y plegamiento de las proteínas, hasta la degradación de un polipéptido típico.

La eficacia de las carabinas para unirse a las cadenas peptídicas, parece que puede ser utilizada con éxito en el aislamiento de antígenos específicos de tumores destinados a la inmunoterapia del cáncer. En el caso de células tumorales, la presencia de estas proteínas en la superficie celular puede servir para caracterizarlas como objetivos específicos, mientras que en el caso de las bacterias, puede servir para elevar su virulencia y darles la capacidad de entrar en las células hospedadoras que poseen un receptor para las proteínas del estrés.

En diversos sistemas se ha demostrado que la exposición a proteínas del estrés o a sus epítomos contribuye a la resistencia a enfermedades tales como la artritis y la diabetes. Estas observaciones tienen su base en que la exposición a flora microbiana, reduce la incidencia de estas enfermedades. Se ha encontrado en ratas una menor

resistencia a la enfermedad, cuando se mantuvieron en ambiente estéril, mientras que cuando se cambiaron a un medio con flora bacteriana, se consiguió restaurar en estos animales la resistencia a la artritis inducida (35).

Se ha descubierto también una conexión entre las carabinas moleculares y las enfermedades autoinmunes. En pacientes con artritis reumatoide, lupus eritematosus y espondilitis anquilosante, se han detectado anticuerpos frente a las proteínas del estrés propias. Si estas observaciones se confirman, pueden proporcionar nuevas posibilidades de diagnóstico y terapia.

Existe ya un fármaco antireumático de actuación lenta, denominado Subreum, de los Laboratorios OM de Ginebra, que se extrae de cepas seleccionadas de *Escherichia coli*. Se administra oralmente a pacientes con artritis reumatoide, y tiene actividad supresora de la enfermedad. Este fármaco contiene carabinas derivadas del microorganismo y desencadena la formación de células T carabina-reativas que reducen la artritis adyuvante. Para comprender este mecanismo, se necesita investigar en los pacientes tratados, las células T que responden, con el objeto de caracterizar el fenotipo inmunológico de tales células respecto a su potencial supresor de la enfermedad (36).

Es también un hecho conocido que las proteínas del estrés son antiapoptóticas y esta capacidad las hace influir negativamente sobre la efectividad de la terapia anticáncer. El investigador se encuentra ante el desafío de encontrar medios para inhibir su expresión, por tecnología antisentido, o neutralizar tal actividad antiapoptogénica, por compuestos especialmente diseñados, que se unan a los sitios activos de estas proteínas. Ya se ha demostrado que los inhibidores de la expresión de las carabinas no producen efectos colaterales indeseados, por tanto, combinar esta inhibición con los antineoplásicos tradicionales, ha de mejorar la efectividad de la terapia anticancerosa y con ello permitir el uso de dosis considerablemente más bajas de los agentes quimioterapéuticos tóxicos (37).

En cardiología, las carabinas pueden jugar un papel crítico en el progreso de la hipertrofia cardíaca y la enfermedad isquémica. Después de la trombosis coronaria las células del músculo cardíaco sufren lesión por privación del oxígeno y la reperusión posterior produce lesiones oxidativas. Sin embargo, las células inducidas para producir grandes cantidades de carabinas moleculares, muestran una resistencia mayor a las agresiones sistémicas súbitas. Una posibilidad para la supervivencia de las células miocárdicas en condiciones isquémicas, puede ser la inducción de la respuesta al estrés por medios farmacológicos.

## **Final**

La terapéutica es una de las áreas que destaca por beneficiarse del conocimiento de la respuesta al estrés. La industria farmacéutica investiga para comprender cómo pueden ser diseñados mejor los fármacos recombinantes sobre la base de proteínas naturales que ya existen. Si se puede aprender de estas proteínas qué es lo que causa un estiramiento en la cadena de aminoácidos que promueva una torsión y plegamiento, entonces las estructuras proteicas diseñadas podrán ser manipuladas con más efectividad (38, 39).

Desde la mosca de la fruta hasta las enfermedades autoinmunes y el cáncer, las carabinas moleculares son moléculas maravillosas que cautivan la imaginación de los investigadores. Muchas son las nuevas vías que se están abriendo mediante el estudio y el conocimiento de la respuesta celular al estrés y los mecanismos implicados en la adaptación. Estamos justamente comenzando una gran aventura que necesita el afianzamiento de nuevos descubrimientos que pongan de manifiesto cómo las células se las arreglan para superar las condiciones hostiles del medio y consiguen adaptarse a ellas en un intento de mantener su supervivencia y la de su especie.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cascales Angosto M (2002) Proteínas del Estrés y Carabinas Moleculares. Proyecciones Clínicas y terapéuticas. Real Academia de Farmacia ISBN 84-932423-0-6
2. Díez-Fernández C y Cascales M (1997) Proteínas del estrés y hepatotoxicidad. En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (coord M. Cascales) Real Academia de Farmacia/Fundación Casares Gil. Madrid, pp 157-181.
3. Minowada G y Welch WJ (1995) Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* **95**, 3-12.
4. Ray PK (1999) Stress genes and species survival. *Mol Cell Biochem* **196**, 117-123.
5. Morimoto RI, Sarge KD y Abravaya K (1992) Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J Biol Chem* **267**, 21987-21990.
6. Cotto JJ y Morimoto RI (1999) Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of the heat-shock factors. *Biochem Soc Symp* **64**, 105-118.
7. Lindquist SC (1986) The heat shock response. *Annu Rev Biochem* **55**, 1151-1191.
8. Santoro MG (2000) Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* **59**, 55-63.
9. Jolly C y Morimoto RI (2000) Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1564-1572.
10. Kauzmann W (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem* **14**, 1-64.
11. Kushner VP (1977) Conformational flexibility and denaturation of biopolymers. Leningrad: Nauka Press.
12. Ptitsyn OB (1992) The molten globule. En: *Protein folding* (ed Creighton TE) Freeman WH & Company. Nueva York, pp 243-300.
13. Gerner EW y Schneider MJ (1975) Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* **256**, 500-550.
14. Rittosa F (1996) Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* **1**, 97-98.
15. Tissieres A, Mitchell HK y Tracy UM (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* **84**, 389-398.
16. Andrés D, Sanz N, Alvarez AM, Díez-Fernández C, Zaragoza A y Cascales M (2000) HSP-70 induction by CsA in cultured hepatocytes. Effect of vitamin E succinate. *J Hepatol* **33**, 570-579.
17. Andrés D, Díez-Fernández C, Castrillo A y Cascales M (2002) Activation of heat shock factor is accompanied by the suppression of nuclear factor kB activity in rat hepatocytes cultures treated with cyclosporine A. *Biochem Pharmacol*.

18. Díez-Fernández C, Andrés D y Cascales M (2002) Protective effects of heat shock against TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis in cultured hepatocytes. *Free Rad Biol Med* (en prensa).
19. Bukau B y Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperones machines. *Cell* **92**, 351-366.
20. Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230
21. Laskey RA, Honda BM, Mills AD y Finch JT (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfer them to DNA. *Nature* **275**, 416-420.
22. Ellis RJ y van der Vies SM (1991) Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **60**, 321-347
23. Ruddon RW y Bedows E (1997) Assisted protein folding. *J Biol Chem* **272**, 3125-3128.
24. Anfinsen CB, y Harber E (1961) Studies on the reduction and reformation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem* **236**, 1361-1363.
25. Levinthal C (1968) *J Chem Phys* **65**, 44-45.
26. Thomas PJ, Qu BH y Pedersen PL (1995) Defective protein folding as a basic of human disease. *Trends Biochem Sci* **20**, 456-459.
27. Welch WJ (1993) How cells respond to stress. *Sci Am* **268**, 56-64.
28. Hayes SA y Dice JF (1996) Role of molecular chaperones in protein degradation *J Cell Biol* **132**, 255-258.
29. Schlesinger DH, Goldstein G y Niall HD (1975) The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* **14**, 2214-2218.
30. Hershko A. y Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
31. Varshavsky A.(1997) The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **22**, 383-387.
32. Hershko A. (1996) Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **21**, 445.
33. Johnston JA Ward CL, y Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-1898.
34. Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO, Guillet JG, Soussi T y Polla BS (1994) Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer* **30A**, 1884-1891.
35. Haque MA (1996) Suppression of adjuvant arthritis in rats by induction of oral tolerance to mycobacterial 65- kDa heat shock protein. *Eur J Immunol* **26**, 2650-2656.
36. van Eden W, van der Zee R, Paul AG, Prakken BJ, Wending U, Anderton SM y Wauben MH (1998) Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammation diseases? *Immunol Today* **19**, 303-307.
37. Jäätelä M (1999) Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Trends Mol Medicine* **31**, 261-271.
38. Macario AJL (1995) Heat shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Int J Clin Lab Res* **25**, 59-70.
39. Pirkkala L, Nykänen P y Sistonen L (2001) Roles of the heat shock transcription factors in the regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* **15**, 1118-1131..