

**INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA DE FARMACIA**

**PROTEÍNAS DEL ESTRÉS Y CARABINAS
MOLECULARES. PROYECCIONES
CLÍNICAS Y TERAPÉUTICAS**

**DISCURSO
EN LA SESIÓN INAUGURAL DEL CURSO ACADÉMICO
DEL 17 DE ENERO DE 2002**

por la
**EXCELENTÍSIMA SEÑORA DOÑA
MARÍA CASCALES ANGOSTO**
ACADÉMICA DE NÚMERO



MADRID - 2002

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
2. GENES DEL ESTRÉS Y SUPERVIVENCIA	9
2.1. Inducción de la respuesta al estrés	19
2.2. Mecanismos de adaptación al estrés	30
3. CARABINAS MOLECULARES	39
3.1. Plegamiento asistido de las proteínas	46
3.2. Reparación de proteínas alteradas	63
3.3. Degradación de proteínas	64
4. INTERACCIONES DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS	79
4.1. Apoptosis	84
4.2. Estrés oxidativo	88
4.3. NFκB	95
5. PROYECCIONES CLÍNICAS Y TERAPÉUTICAS	101
5.1. Enfermedades neurodegenerativas	103
5.2. Oncogénesis y Cáncer	109
5.3. Infección	114
5.4. Sistema inmune	116
5.5. Fármacos, agentes tóxicos y hepatotoxicidad	127
5.6. Envejecimiento	131
6. CONCLUSIONES	133
7. BIBLIOGRAFÍA	139
8. AGRADECIMIENTOS	162
9. GLOSARIO Y ABREVIATURAS	163
10. EPÍLOGO	167
11. ÍNDICE	169
	169

*Excelentísimo Señor Presidente
Excelentísimos e Ilustrísimos Señoras y Señores Académicos
Señoras y Señores*

Es un honor muy singular para un Académico pronunciar el Discurso protocolario en la Sesión Inaugural del Curso de la Real Academia de Farmacia. Por esa razón hoy me siento profundamente agradecida al Presidente de esta Corporación y a su Junta de Gobierno por haberme encargado esta importante misión.

Hace quince años que, en esta misma tribuna, ingresé como Académica de Número en la Real Academia de Farmacia. Entonces mi discurso de ingreso versó sobre un tema de investigación al que yo me había dedicado durante muchos años, «Aspectos Bioquímicos en Hepatotoxicidad Experimental», y entonces también, yo justificaba mi elección en que nada puede expresarse con más énfasis que el propio trabajo.

Después de estos quince años, en los que he esperado con ilusión y mucha impaciencia que me fuera encomendado este Discurso, me cabe hoy la inmensa satisfacción de dirigirme a ustedes con un tema apasionante y de máxima actualidad: **PROTEÍNAS DEL ESTRÉS Y CARABINAS MOLECULARES**. Como entonces, este tema forma parte de mis investigaciones actuales que se centran en el amplio campo de las «respuestas celulares a la agresión» o «respuestas celulares al estrés».

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.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos se encuentran continuamente amenazados por condiciones ambientales adversas que causan situaciones de estrés agudo o crónico. Para sobrevivir a los diferentes tipos de agresión, los organismos han tenido que adaptarse desarrollando complejos mecanismos de defensa frente a las diferentes formas de estrés. Las células responden a estas 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* (HSP) o *proteínas del estrés* (1-4). Esta respuesta adaptativa, protege a la célula del ataque de una gran variedad de agentes potencialmente letales, entre los que se incluye la hipertermia, los agentes oxidantes, así como la inflamación (5-7). 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, y todavía hoy se considera como la inductora principal de esta respuesta. Los términos alternativos para la denominación de esta respuesta y las proteínas asociadas con ella son «respuesta al estrés», y «proteínas del estrés», respectivamente. Estos términos se consideran más apropiados porque otros muchos agentes agresivos desencadenan la misma respuesta adaptativa, para proteger a la célula de situaciones adversas de naturaleza térmica y no térmica.

A pesar de su designación como *proteínas del choque térmico* o *proteínas del estrés*, la mayoría de estas proteínas se expresan de forma constitutiva en células normales no sometidas a situaciones

de estrés, 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 (8). 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.

2. GENES DEL ESTRÉS Y DE LA SUPERVIVENCIA

Cuando la primera célula surgió en la superficie de nuestro Planeta, hace más de 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 de vida con capacidad para superar tales hostilidades. Para conseguir esta adaptación, las células sufrieron una serie de manipulaciones bioquímicas, que condujeron a modificaciones en su 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 las especies de los organismos vivos que existieron en algún momento, al no superar la presión agresiva del medio ambiente, fueron sucumbiendo sin dejar descendientes. Durante el proceso de la evolución biológica sólo lograron sobrevivir aquellos organismos mejor equipados, como resultado de modificaciones físicas y químicas introducidas en su estructura genómica. Así, se seleccionaron los organismos que habían logrado adaptarse a las condiciones ambientales 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 (9).

Ganancias Evolutivas

Se ha propuesto que fueron estas secuencias genómicas singulares y muy eficientes, las que proporcionaron a los seres vivos la capacidad para adaptarse al ambiente hostil y sobrevivir. Estas secuencias se han conservado en el genoma, superando la barrera de las especies (10), y en el momento necesario, los organismos han podido utilizarlas permitiendo que se expresen libremente. Los genes de respuesta al estrés se activan para superar la acción de ciertos eventos agresivos, tales como, las variaciones de temperatura (choque térmico), el estrés metabólico y oxidativo, fármacos o carcinógenos, radiaciones, etc. Es interesante resaltar que aunque la naturaleza de los agentes estresantes sea diferente, en términos físicos o químicos, las reacciones biológicas que inducen son similares. Todos ellos inducen la expresión de las *proteínas del estrés* (HSP), lo que indica que su transcripción en respuesta al estrés puede ser activada por agentes inductores del estrés o agentes estresantes de diferente naturaleza.

Por tanto, es necesario constatar que la mayor urgencia de un organismo para sobrevivir es tratar de adaptarse a las condiciones que prevalecen en el ambiente, para permanecer en un estado normal óptimo que le permita la perpetuación de sí mismo. Todos los organismos están continuamente expuestos a la acción de agentes estresantes ambientales, tóxicos o carcinogénicos, fisiológicos y metabólicos. La supervivencia de estos organismos supone, por tanto, que poseen una capacidad intrínseca que les permite resistir la acción de estas agresiones. Los mecanismos inherentes de resistencia al estrés, codificados por los genes de respuesta al estrés, son una muestra de las *ganancias evolutivas*.

Superfamilia de genes del estrés

Un elevado número de genes de respuesta al estrés se ha organizado en la superfamilia de genes del estrés. Tales genes pueden actuar y funcionar de manera armónica para cubrir las necesidades del organismo. Durante muchos años, los científicos han tratado de

elucidar los mecanismos intrínsecos implicados en el mantenimiento de cada ser vivo. En primer lugar, hay que destacar de nuevo, que, aunque la naturaleza de los agentes agresivos sea diferente, las reacciones que ellos inducen son de naturaleza similar. Por otra parte, un tipo particular de estos agentes es capaz de inducir una amplia colección de reacciones necesarias para proteger al organismo de los efectos perniciosos de los diferentes tipos de agresiones físicas, químicas y biológicas. Por tanto, mediante el uso de un agente agresivo, se puede activar una serie de secuencias genómicas de la superfamilia de genes del estrés y como resultado de dicha activación, pueden expresarse un gran número de biomoléculas, que actúan en una cascada de reacciones para paliar los efectos lesivos causados por la agresión (11).

Para comprender el funcionamiento de los mecanismos de respuesta al estrés, es necesario profundizar en la organización del DNA. Se sabe que 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 con el término «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 y se activa sólo 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. No se sabe si todas las células poseen todos los tramos de la superfamilia de genes del estrés o si éstos se distribuyen en diferentes tipos celulares. Lo más lógico sería el último caso, pero es mucho lo que aún se necesita investigar para delinear el mecanismo que gobierna la expresión de la superfamilia de los genes del estrés (Tabla 1).

TABLA I.

Superfamilia de genes de resistencia al estrés (11)	
Enzimas fase I y II, glutatión	Biotransformación, detoxificación y eliminación de productos tóxicos
Citoquinas	Diferenciación; proliferación y expansión de macrófagos e inmunocitos
Factores del crecimiento	Proliferación y expansión de varios tipos celulares
Hormonas	Estimulación de células precursoras
SOD, catalasa	Potenciación del sistema antioxidante
Proteínas del choque térmico	Carabinas moleculares y péptidos anti-génicos
Enzimas reparadores	Endonucleasas, ligasas, proteasas

Cuando los organismos vivos intentan resistir a las embestidas medioambientales agresivas, activan unos genes que codifican una serie de proteínas específicas, cada una de ellas responsable de contrarrestar las alteraciones, específicas o no específicas, inducidas por la situación. Tales proteínas pueden presentar una gran variedad de funciones, tales como:

- a) enzimas que catalizan la biotransformación y detoxificación de fármacos;
- b) hormonas que potencian la proliferación y diferenciación celular;
- c) proteínas estructurales reparadoras de lesiones estructurales;
- d) anticuerpos que anulan la acción de bacterias antigénicas, virus, células extrañas y tejidos;
- e) citoquinas que potencian la proliferación, diferenciación y producción de factores del crecimiento;
- f) plegamiento y transporte de proteínas (carabinas moleculares);
- g) proteínas señalizadoras que transmiten mensajes moleculares desde la membrana hasta el núcleo;
- h) proteínas de unión al DNA para la activación y expresión de productos genéticos (factores de transcripción).

Estudios recientes sobre las proteínas del estrés, han proporcionado evidencias importantes en bacterias sobre los genes implicados en los mecanismos de resistencia frente al ataque inmune del organismo hospedador, además de aquellos que inducen inmunidad, frente a ellas, en el hospedador. Todo ello demuestra la existencia en los microorganismos, de genes de respuesta al estrés, que les permiten controlar su crecimiento y proliferación. La naturaleza ha dotado a cada especie con secuencias genéticas singulares para proporcionar mecanismos de resistencia adecuados frente a los peligros físicos, químicos y biológicos, de la naturaleza. El dogma evolutivo de «*supervivencia del mejor dotado*» se apoya en la capacidad de los organismos de perpetuar los genes de respuesta al estrés y los genes de resistencia al estrés (11).

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*: la progresión del ciclo celular, el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y el estímulo hormonal.
- 2) *Estado fisiopatológico*: la infección por virus y bacterias, la inflamación, la respuesta inmune, la lesión oxidativa, la hipertrofia, la isquemia, el envejecimiento, el cáncer, etc.
- 3) *Situaciones de estrés medioambiental*: elevación de la temperatura, inhibidores del metabolismo energético, metales de transición, análogos de aminoácidos, fármacos hepatotóxicos, etc. (Figura 1).

Las HSP, por tanto, desempeñan una función activa en la defensa celular, aunque muchas de estas proteínas, las que se expresan constitutivamente en células normales no sometidas a situaciones de estrés, intervienen también en gran número de procesos biológicos fundamentales. La mayoría de las HSP poseen la capacidad de unirse de manera transitoria a diversas proteínas celulares durante la síntesis, el transporte y la degradación proteicas. Debido a su abun-

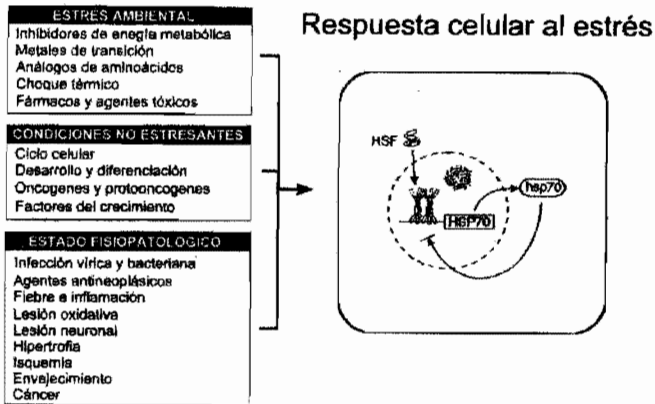


Figura 1. Inductores de la respuesta celular al estrés. Activación del HSF en respuesta a estrés ambiental o patológico, que resulta en elevar la expresión de las HSP. Representación de las tres situaciones que inducen la expresión de proteínas del estrés: 1) estrés fisiológico/ambiental; 2) condiciones no estresantes tales como crecimiento celular y desarrollo, y (3) estados fisiopatológicos. La activación del 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 (34).

dancia y a su capacidad de interactuar con las proteínas celulares, las HSP se encuentran en posición privilegiada para influir en muchos procesos celulares y de ahí su importancia y su posible uso como agentes de diagnóstico y agentes terapéuticos.

Una misión fundamental de la célula viva es la producción de proteínas funcionales bien definidas en su conformación tridimensional derivada de su estructura primaria, por tanto, el plegamiento proteico y el ensamblaje de las subunidades proteicas recién sintetizadas son aspectos esenciales de la vida. Estas funciones las realiza una maquinaria celular sofisticada conservada a lo largo de la evo-

lución procariota y eucariota, asistida por dos clases de proteínas. La primera incluye una serie de enzimas convencionales que catalizan reacciones específicas de isomerización que pueden limitar la tasa de plegamiento de algunas proteínas, mientras que en la segunda son las carabinas moleculares las que estabilizan las estructuras plegadas o incompletamente plegadas y protegen de la interacción inapropiada, entre o en el interior de las cadenas proteicas, que conduce a la agregación.

Un polipéptido naciente, recién sintetizado, contiene en su propia secuencia de aminoácidos toda la información que necesita para plegarse de manera adecuada y conseguir un estado nativo funcional (13). En el proceso de plegamiento participan otros factores, además de la secuencia de aminoácidos, y las carabinas moleculares son parte de dicho proceso (14-17).

Durante la síntesis, transporte, ensamblaje en oligómeros y secreción, las proteínas, atraviesan por estados o conformaciones inestables, fácilmente agregables. Durante el ejercicio normal de sus funciones como moléculas maduras, las proteínas pueden incluso pasar por esas conformaciones frágiles. Las *carabinas moleculares* han surgido para proteger a las proteínas cuando se encuentran en estados inestables y necesitan asistencia externa. Las carabinas moleculares se consideran instrumentos celulares para ayudar a los componentes proteicos a conseguir su conformación funcional correcta. Estos instrumentos se utilizan también por la célula para mantener la conformación durante el estrés y para facilitar su recuperación después de la pérdida parcial de dicha conformación debido a la acción de agentes estresantes. Además, las carabinas moleculares intervienen en la traslocación de las proteínas desde su sitio de origen hasta su destino final, donde se supone que tienen que ejercer su función. Este destino final puede ser la mitocondria, el retículo endoplásmico, el citosol, etc. Por lo tanto, es lógico pensar que las carabinas moleculares interaccionen estrechamente con las proteínas y sean capaces de reconocer los sitios cuya conformación no es la correcta.

En la actualidad se utiliza en general la designación HSP para todas las proteínas del estrés, no solo para aquellas típicas de la

respuesta al choque térmico, y el término respuesta al choque térmico para cualquier respuesta sea cual fuera el agente estresante. De esta manera, las proteínas del estrés se denominan HSP (heat shock proteins) seguido de un número que indica la masa molecular determinada por SDS-PAGE en kilodaltons (kDa). Las mejor conocidas entre las propias de eucariotas son las HSP8, HSP27, HSP70, HSP73 y HSP110. También existen otras proteínas del estrés que se identificaron inicialmente como específicas de la respuesta celular a la privación de glucosa (1). Son las denominadas Grp (glucose regulated protein) con un número referente a su masa molecular. Las mejor caracterizadas en eucariotas son las Grp78, Grp94 y Grp170.

Por tanto, las proteínas del estrés en mamíferos pueden dividirse en dos grupos teniendo en cuenta su modo clásico de inducción: las proteínas del choque térmico (HSP) y las proteínas reguladas por glucosa (Grp). Unas y otras se identifican por sus aparentes masas moleculares. (Tabla 2).

Se ha observado que los miembros de la familia Grp se expresan más en células privadas de glucosa, o tratadas con ionóforos de calcio cuando se someten a condiciones anóxicas o en respuesta a agentes reductores como el mercaptoetanol. La Grp78 es la proteína que se une a la inmunoglobulina de las células B y coprecipita con la Grp 170 y la Grp 94 en lisados de células estresadas de ovario de hamster chino. La proteína Grp170 se encuentra retenida en el lumen del retículo endoplásmico, se expresa constitutivamente y puede jugar un papel en el plegamiento de las inmunoglobulinas en cooperación con las Grp78 y Grp94 (18).

Tanto las HSP como las Grp se localizan en varios compartimentos de la célula eucariota: núcleo, nucleolo, citosol, mitocondria, retículo endoplásmico y cloroplastos (en vegetales). En las células procariontas, que carecen de orgánulos, se localizan en el citoplasma, en la membrana citoplasmática y en el espacio periplásmico.

Existen HSP que se sintetizan en ausencia de estrés, es decir son constitutivas. Si en una célula existen las dos versiones de una HSP, una inducible y otra constitutiva, la constitutiva se denomina HSC

TABLA 2. *Proteínas del estrés*

Nombre	Tamaño (kDa)	Homólogo bacteriano	Localización	Función
Ubiquitina	8		Citosol/núcleo	Degradación proteínas proteosoma (no lisosómica)
HSP10	10	GroES	Mitocondria/cloroplasto	Cocarabina de la HSP60
HSP20-30	20-30		Citosol/núcleo	Carabinas moleculares. Reguladoras de la actina
HSP33	33		Citosol	Carabina molecular. Estrés oxidativo
HSP47	47		Retículo endoplásmico	Carabina colágeno
HSP56	56		Citosol	Forma parte del receptor hormona esteroidea; se une al FK506
HSP60	60	GroEL	Mitocondria/cloroplasto	Carabina molecular (chaperonina)
TCP-1	60	GroEL	Citosol/núcleo	Carabina molecular relacionada con Hsp60
HSP72	70	DnaK	Citosol/núcleo	Carabina molecular inducible
HSP73	70	DnaK	Citosol/núcleo	Carabina molecular constitutiva
HSP75	70	DnaK	Mitocondria/cloroplasto	Carabina molecular constitutiva
Grp78 (BiP)	70	DnaK	Retículo endoplásmico	Carabina molecular constitutiva
HSP90	90	HtpG	Citosol/núcleo	Forma parte del receptor hormona esteroidea; carabina molecular
HSP104/110	104/110	familia CLP	Citosol/núcleo	Carabina molecular

(heat shock cognate protein). Existen ejemplos de HSP70 y HSC70 en eucariotas.

Los límites entre las diferentes familias no están bien definidos, pero la clasificación ayuda a organizar la información recientemente obtenida y enmarca a las nuevas HSP. Además, las proteínas de una familia pueden interactuar con las de otras para el ejercicio de sus funciones. Por ejemplo, la proteína DnaK de 70kDa, que representa la HSP70 procariota, es una carabina molecular que interactúa con la DnaJ de 43kDa, otra carabina, y con la GrpE de 24 kDa. Las tres forman un complejo que actúa como una máquina carabina molecular (16). Otra carabina molecular bacteriana de 60 kDa, la proteína GroEL, interactúa con la GroES de 10 kDa. Estos ejemplos introducen el concepto que las HSP pueden necesitar la interacción de otras HSP o no HSP para llevar a cabo sus funciones en la célula. Una cadena de reacciones entre las HSP y las moléculas auxiliares desencadena la formación de complejos mejor equipados para asistir a las proteínas que los necesitan.

La simple elevación de unos grados por encima de la temperatura normal da como resultado una menor expresión de genes activos en condiciones normales y una mayor expresión de los genes que codifican las HSP. La respuesta al choque térmico, observada por Ritossa hace ya cuarenta años en las glándulas salivales de la mosca de la fruta *Drosophila* (19), ha proporcionado un medio óptimo para estudiar una serie de cambios rápidos en la expresión génica. Frente a elevaciones de la temperatura, se han detectado cambios similares en células de todos los organismos investigados, ya fueran bacterias, plantas, levaduras o mamíferos. Las HSP de los diversos organismos presentan un elevado grado de conservación respecto a su estructura primaria, mecanismos de regulación y función bioquímica.

Aunque la expresión de las proteínas del estrés proporciona a las células un mecanismo de protección frente a una posterior situación de estrés, el incremento intracelular de estas proteínas debe ser transitorio, ya que su acumulación por largos períodos de tiempo puede resultar pernicioso. Esto indica que la expresión de las HSP ha de estar sujeta a un estricto control. Estudiando la expresión de las HSP a nivel transcripcional y pretraduccional en células termotole-

rantes y no termotolerantes, se ha observado una disminución en la transcripción y en la estabilidad del mRNA en células termotolerantes, lo que indica que en éstas últimas la expresión de las HSP se encuentra limitada para evitar los potenciales efectos citotóxicos de estas proteínas (20). Un medio de prevenir la acumulación de las HSP es elevar la tasa de degradación del mRNA HSP, lo cual ha de contribuir a limitar la expresión de los genes *hs* (*heat shock*). Se ha observado que el acúmulo intracelular de la HSP70, en ausencia de estrés, afecta a la división celular (21).

Una importante característica de la respuesta al estrés es la capacidad de inhibir transitoriamente la expresión génica de otras proteínas. Este efecto parece que es particularmente efectivo con respecto a la expresión génica proinflamatoria. Por ejemplo, la respuesta al estrés inhibe la expresión de citoquinas en células mononucleares (22, 23) y fibroblastos (6), así como la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), mediada por citoquinas en hepatocitos y neuronas en cultivo (24, 25). También la respuesta al estrés inhibe la translocación nuclear del NF- κ B inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF α), en una línea celular de adenocarcinoma de pulmón (células A549). Se ha sugerido que esta inhibición se debe a la inducción de la expresión y estabilización del factor inhibidor κ B (I- κ B) que impide la liberalización y la traslocación al núcleo del NF- κ B (26)

2.1. 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. La respuesta al estrés, caracterizada por una mayor expresión génica de las HSP, se induce por exposición de las células y tejidos a condiciones extremas que causan situaciones de estrés agudas o crónicas. La función principal de muchas de las proteínas del estrés 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 la supervivencia y la muerte. Muchos de los agentes o tratamientos que inducen la respuesta al

estrés comparten la característica de afectar de un modo adverso la conformación y la función de las proteínas.

Factores de transcripción HSF

La activación transcripcional de los genes *hs*, que conduce a la síntesis de las HSP, está regulada por una familia de factores de transcripción denominados factores del choque térmico o HSF (heat shock factors), que responden a estímulos externos, tales como temperatura elevada, y a las diversas situaciones adversas fisiológicas y ambientales antes mencionadas. El HSF es una proteína transreguladora que requiere, una vez activada, trasladarse al núcleo donde reconoce a un elemento modulador, el HSE (heat shock element) localizado en los promotores de los genes *hs*. En células normales en estado de reposo, el HSF se mantiene en el citosol en forma de monómero, y en respuesta a cualquier estímulo agresivo, se traslada al núcleo donde se oligomeriza. Con la oligomerización, en este caso trimerización, el HSF adquiere la capacidad de unirse a una secuencia de nucleótidos consenso en la molécula de DNA, denominada elemento del choque térmico (HSE), localizada dentro del elemento promotor de aquellos genes que codifican para las proteínas del estrés (27). La trimerización del HSF es esencial para su función, ya que le proporciona la afinidad necesaria para unirse al DNA y para la interacción con el HSE. La unión del HSF al DNA, mediante el dominio de enlace en el terminal amino, afecta la activación transcripcional a través de secuencias en el terminal carboxílico. La fosforilación es otro mecanismo por el cual se modula la forma HSF en mamíferos. La fosforilación se verifica en residuos específicos de serina y aparece tanto en los HSF que activan la expresión de la HSP constitutiva como de la inducible.

Los HSE están formados por secuencias de la cadena del DNA integradas por una serie de nucleótidos, localizados en el promotor de los genes que codifican para las proteínas del estrés. De este modo, al unirse el trímero HSF con el HSE, se activa la transcripción de los genes del estrés *hs*, lo cual conduce a la síntesis del mRNA correspondiente, a la síntesis en el retículo endoplásmico de las proteínas y a la acumulación intracelular de las HSP. La estructura básica del

HSE tiene la secuencia 5'-nGGAn-3' o su orientación opuesta 5'-nTTCn-3'. El número de repeticiones de pentanucleótidos puede ser variable (28 - 31), pero un HSE funcional está compuesto al menos por tres pentámeros y la reiteración adicional de unidades pentaméricas ocasiona una mayor afinidad en las interacciones entre el HSF y el HSE. El HSE de los promotores de la HSP70 y la HSP90, se compone de cinco y seis unidades pentaméricas, respectivamente, en cercana proximidad a los elementos promotores basales, cuya función es independiente de la respuesta al estrés. El HSF puede reaccionar con el HSE, bien directamente a temperatura normal o después de su activación por cualquier situación de estrés. En el primer caso, descrito en levaduras, se forma un complejo HSE-HSF, que puede ser activado por la fosforilación del HSF inducida por temperatura. El segundo caso, descrito en organismos superiores, consiste en la formación del complejo HSF-HSP70 en condiciones normales. El HSF se libera de este complejo por elevación de la temperatura o frente a cualquier situación de estrés, y forma el trímero, el cual puede unirse al HSE y activar la transcripción del gen *hsp70*. La disociación del complejo HSF-HSP70 ocurre debido a que es mayor la afinidad de la HSP70 por las proteínas desnaturalizadas que por el HSF. Esta regulación es similar a la regulación de la expresión de los genes eucariotas por los intensificadores (enhancers). En condiciones normales, unos segmentos de secuencias represoras inhiben la síntesis de las HSP. Estos segmentos están localizados en lugares situados en posición anterior en la vecindad de HSE.

Se han propuesto diversos modelos de activación del HSF y de autorregulación de la HSP70 (32, 33). En células no estresadas, el HSF se mantiene en el citosol en forma de monómero, sin capacidad para trasladarse al núcleo y unirse al DNA, por su asociación/interacción con la HSP70. El choque térmico o cualquier otra situación estresante, al elevar la concentración intracelular de proteínas desnaturalizadas o no adecuadamente plegadas, hace que estas proteínas utilicen la HSP70 disponible y en caso de agotarla, tendrán que utilizar la HSP70 que se encuentra unida al HSF. El monómero HSF una vez liberado de la HSP70, puede trasladarse al núcleo donde oligomeriza formando el trímero que posee capacidad para unirse al HSE. El trímero entonces, una vez fosforilado, activa la expresión los genes *hs*. La activación transcripcional de estos genes promueve,

a su vez, la síntesis de la HSP70. Cuando se ha sintetizado suficiente cantidad de HSP70 para evitar que la concentración intracelular sea demasiado elevada, la HSP interacciona con el HSF activo y se forma nuevamente el complejo HSF-HSP70. La formación de este complejo conduce entonces a la disociación del HSF del DNA (34, 35).

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. Oligomerización;
3. Traslado al núcleo;
4. Unión al HSE;
5. Incremento de la actividad transcripcional.

En vertebrados y en plantas se han aislado varios miembros de la familia HSF (HSF1-4). Se asume que el HSF1, el homólogo funcional en vertebrados del HSF de levadura y mosca, se activa por diversas formas de estrés. El HSF3, el único HSF encontrado en aves, funciona como un factor de transcripción que responde al calor. El HSF2, al contrario que HSF1 y HSF3, no se activa por los estímulos estresantes clásicos, sino en condiciones relacionadas con el desarrollo. Ningún HSF, incluyendo el HSF2, es capaz de sustituir funcionalmente al HSF1, ni restablecer la respuesta al estrés en ratones *knockout* o en células derivadas de estos animales (36). Sin embargo, el funcionamiento de los distintos HSF se superpone a veces, dependiendo de las señales estimuladoras. Por ejemplo, el HSF2 y el HSF4, pero no el HSF1, son capaces de complementar el defecto de viabilidad y conferir termotolerancia en células de *Saccharomyces cerevisiae* que acarrean una delección letal del HSF (37). Las diferentes actividades de los HSF no excluyen la posibilidad que miembros diferentes de la familia HSF cooperen para regular la expresión de sus genes.

En levadura y *Drosophila* se ha identificado sólo un HSF, mientras que en vertebrados se han clonado los cuatro miembros de la familia

HSF antes citados (HSF 1 - 4) (38 - 43). Se ha observado, además, que el HSF aislado de levadura y de células humanas que han sufrido un choque térmico, se encuentra fosforilado. Se ha demostrado que el HSF1 es el activador de la transcripción génica en respuesta a altas temperaturas, metales pesados y análogos de aminoácidos, mientras que el HSF2 no parece activarse por estos inductores. El HSF1 manifiesta varias propiedades de acuerdo con su papel, que incluyen las antes mencionadas de traslocación al núcleo, oligomerización y unión al DNA inducida por estrés, características que no se dan en el HSF2. Se ha sugerido que el HSF2 puede intervenir en la activación de la expresión de los genes del choque térmico en ausencia de estrés fisiológico, quizás durante la diferenciación y el desarrollo. Por tanto, en células de mamíferos, el HSF1 media la respuesta ubicua de los estímulos estresantes, mientras que HSF2 se expresa de manera constitutiva activa y abundante en células de carcinoma embrionario de ratón en el estado de blastocito durante la embriogénesis del ratón y durante la espermatogénesis, sugiriéndose para HSF2 un papel como regulador del desarrollo (44-48). El HSF2 al unirse al HSE situado en la región promotora del gen *hsp70* conduce a una abundante expresión de la HSP70 durante la diferenciación de los eritrocitos mediada por hemina en células K562 (49, 50). Durante la embriogénesis, sin embargo, la unión del HSF2 al DNA no coincide con el perfil de expresión de ninguna de las HSP conocidas (47). La expresión de la tioredoxina se induce en células K562 en respuesta a hemina de manera dependiente de HSF2 (51), lo que demuestra que el HSF2 debe regular otros genes además de los *hs*. Más recientemente se ha descrito que el papel de los distintos HSF se superpone dependiendo de las señales estimuladoras. Por ejemplo, la activación del HSF2 y la consecuente inducción transcripcional de los genes *hs*, se ha descrito en células donde la vía ubiquitina proteosoma había sido inhibida (52). También se ha encontrado que células de levadura mutadas, que acarrean una delección letal HSF, pueden ser rescatadas por el HSF2 humano, pero no por el HSF1 (37).

El HSF1 es el prototipo de los factores de transcripción del choque térmico. En vertebrados el HSF1 media la expresión genética de los genes *hs* sobre la base de su capacidad de unión al DNA una vez traslocado al núcleo y oligomerizado, en respuesta a agentes ambien-

tales, cadmio, sulfato o exposiciones a análogos de aminoácidos como la L-azatidina-2-carboxílico o inhibidores de las proteasas (53). La oligomerización de este factor puede ser reprimida en el monómero por interacción de dominios de oligomerización HR. La regulación negativa del HSF1 la proporciona la HSP70 y también otras HSP. Concentraciones bajas de HSP90 activan al HSF1 *in vitro*, mientras que la geldamicina, agente que se une e inhibe a la HSP90, activa al HSF1. Esto indica que el complejo HSP90 se encuentra presente en células no estresadas, pero que se disocia con el estrés. Esto proporciona evidencia que la HSP90 por sí misma o en colaboración con complejos multitarabinas, puede ser un represor importante de HSF1. La represión de la actividad HSF1 por interacción con varias HSP es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular (36). Además de la regulación «feedback» del HSF1 por las HSP (Figura 1), otras proteínas se unen también al HSF1 impidiendo su activación. Por ejemplo, una proteína nuclear de 8,5 kDa, denominada *proteína de enlace al HSF1* (HSBP1), presente en un tipo de levadura, interacciona con el dominio de oligomerización de un HSF1 activo, afectando con ello negativamente la unión al DNA (54). Durante la inactivación del HSF1 a monómero inerte, la HSBP1 se asocia con la HSP70. Estas proteínas que interaccionan con el HSF1 actúan como reguladores negativos de la actividad HSF1, sugiriendo que ha de ser necesario un complejo múltiple para mantener el HSF1 en condiciones de ser activado. Es interesante tratar de profundizar sobre la posible existencia de algún regulador positivo del HSF1 o demostrar si la activación del HSF1 es una propiedad intrínseca conservada durante la evolución que permite su autoactivación después del estímulo estresante.

Los HSF presentan dos regiones muy conservadas: un dominio terminal de unión al DNA, de unos 100 aminoácidos y un dominio adyacente de trimerización de repeticiones (HR-A/B) hidrofóbicas (cremalleras de leucina), que al parecer son capaces de formar interacciones hidrofóbicas enrolladas. Para los eucariotas superiores existe otro dominio cercano al término COOH, que parece interaccionar directamente con la cremallera de leucina, previniendo así la trimerización en condiciones normales (Figura 2). El dominio cercano al terminal -COOH, aunque menos conservado en su secuencia, constituye el dominio de activación de la transcripción. La supresión de la

trimerización del HSF1 está mediada por otra región de repeticiones hidrofóbicas (HR-C) adyacente al terminal carboxilo de la proteína

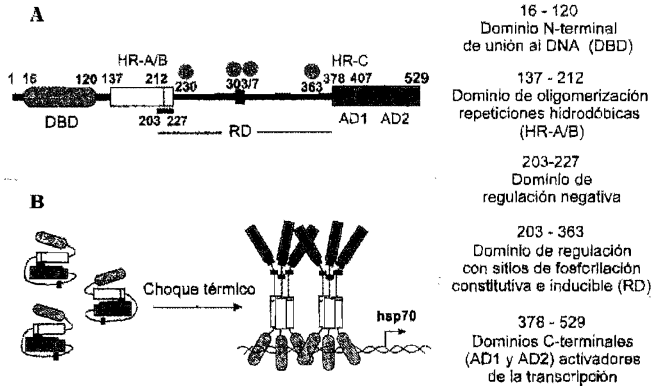


Figura 2. (A) Motivos estructurales del HSF1: Dominio de enlace al DNA en el terminal N (DBD) dominio de regulación negativa (HR-A/B) y dominio de activación (HR-C). Se muestran también otros dos dominios de fosforilación constitutiva e inducible (RD). **(B) Regulación del HSF1.** En células en situación normal existe una interacción entre el dominio de regulación negativa y el dominio de activación (bloqueo de la activación). Durante el choque térmico o cualquier situación de estrés, el HSF1 se activa por disrupción de la interacción entre el dominio de regulación negativa y el dominio de activación en favor de nuevas interacciones moleculares del dominio HR-A/B, que conducen a la trimerización del HSF1 y a la consiguiente adquisición de la actividad de enlace al DNA (34, 58).

Regulación del HSF1 y vías señalizadoras

Hay que insistir en los mecanismos que conducen a la regulación estricta del HSF1, ya que la capacidad de unión al DNA de este factor y su capacidad transactivadora se encuentran desacopladas.

Esto se ha observado en *Saccharomyces cerevisiae* donde el HSF se une al DNA constitutivamente, pero necesita de un posterior estímulo para que se active la transcripción. El tratamiento de células de mamíferos con salicilato sódico y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos, induce la unión del trímero HSF1 al DNA sin que ello lleve consigo la inducción de la actividad transcripcional. Esto demuestra que también en células de mamíferos la actividad de unión del HSF1 al DNA no se encuentra acoplada con la actividad transcripcional. En células de mamíferos, la fosforilación del HSF1 es un determinante importante de la potencia transactivadora. El intermediario transcripcionalmente inerte inducido por los fármacos anteriormente mencionados, puede transformarse en transcripcionalmente activo mediante una posterior exposición a un choque térmico. El único cambio que se puede detectar entre la forma inerte y la forma activa del intermediario es la hiperfosforilación del HSF1 (55). En la figura 2 se muestra que el HSF contiene dos dominios de activación carboxiterminales, AD1 y AD2, que están bajo control de un dominio regulador (RD) localizado en el centro de la cadena proteica (56). Como AD1 no parece estar regulado por calor, el dominio regulador (RD) del HSF1 se ha propuesto que juega un papel clave en la sensibilidad al estrés térmico en humanos. La fosforilación constitutiva de dos residuos serina/prolina (303/307) es importante para la regulación negativa de la actividad transcripcional del HSF1, ya que la sustitución de serina por alanina causa una competencia transcripcional. La fosforilación constitutiva en 303 también es crítica para la regulación negativa de HSF en condiciones normales. El papel positivo de la fosforilación en la regulación del HSF1 está siendo estudiado intensamente en la actualidad y hasta la fecha se ha reconocido que la forma de HSF1 fosforilada en 230 se eleva después de un choque térmico y que la sustitución de la serina en 230 por alanina va acompañada por un descenso en la actividad transcripcional del HSF1 humano (36).

Formación de gránulos HSF1 inducida por estrés

Se dedica últimamente mucha atención a unas estructuras específicas localizadas en el núcleo, denominadas cuerpos nucleares, que probablemente sirven como centros para controlar las actividades

de diversos reguladores transcripcionales. En 1993 Sarge *et al.* (57) observaron que durante el choque térmico, el HSF1 se localiza en el núcleo de células humanas (no en murinas), formando unas estructuras a modo de gránulos. Los gránulos de HSF1 se forman también en otras situaciones de estrés, tales como en presencia de inhibidores del proteosoma, exposición a metales pesados y al análogo de aminoácido azetidina, pero no por el antiinflamatorio salicilato, el cual no induce la hiperfosforilación ni la actividad transcripcional del HSF1. Por tanto, parece ser que dependiendo del estímulo estresante, los acontecimientos asociados con la activación del HSF1 se encuentran afectados de diferente manera (58).

La formación de gránulos de HSF1 parece que es una propiedad intrínseca de las células humanas y no del HSF1, ya que dichos gránulos han podido ser detectados al expresar el HSF1 exógeno de ratón en células humanas (59). La aparición de gránulos de HSF1 es paralela a la activación de este factor y a la inducción transitoria de la transcripción de los genes *hs*. Después de la recuperación del estrés, los gránulos de HSF1 no se detectan, pero en caso de otra situación de estrés, el HSF1 se localiza de nuevo en las mismas estructuras. Aunque la estructura y función de los gránulos no está aún clara, pues no se localizan con ninguna estructura nuclear previamente descrita, se ha propuesto que pueden ser sitios donde el HSF1 activo se almacena y se recicla, coordinando así la regulación de la expresión de los genes *hs*.

Desde la clonación del primer HSF de vertebrados hace ya diez años (39), se ha demostrado la gran cantidad de respuestas celulares que los distintos HSF pueden mediar. La figura 3 muestra las diferentes funciones de los HSF. De acuerdo con esta figura, los diversos estímulos exógenos y endógenos activan a los distintos miembros de la familia HSF, llevando en la mayoría de los casos, a la activación de la expresión de los genes *hs*. El HSF1 no es sólo un factor de estrés, sino que también se encuentra involucrado en procesos relacionados con el desarrollo y la diferenciación. El uso de animales transgénicos o dobles *knockout* y de las líneas celulares derivadas de ellos, permitirá esclarecer el papel específico del HSF2 y la relación de interdependencia entre los distintos HSF.

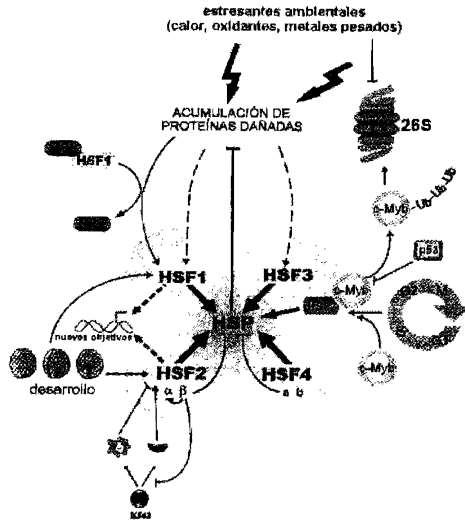


Figura 3. Diferentes funciones del HSF. Los agentes estresantes ambientales y las disfunciones en la vía ubiquitina-proteosoma, inducen la acumulación de proteínas aberrantes y de vida corta, las cuales a su vez llevan a la disociación de los complejos HSF1/HSP y a la activación del HSF1. La activación de la respuesta al estrés conduce en sus últimas causas a la síntesis de las HSP, ello conlleva la formación de un bucle de control negativo para la atenuación de la respuesta al estrés. Mas allá de la respuesta al estrés, el HSP3 coopera con c-Myb para asegurar un suministro adecuado de HSP, ya que se observa un mayor requerimiento de ellas durante la progresión del ciclo celular. La unión de p53 a HSP3 interrumpe la interacción HSF3-c-Myb lo que conduce a la degradación de c-Myb mediada por ubiquitina y la inhibición de la expresión de HSP. El HSF2 se activa en ciertas condiciones del desarrollo y en la diferenciación eritroide de células K562. Durante la diferenciación megacariocítica, la expresión del HSF2 se inhibe en células K562. La isoforma HSF2- β es capaz de inhibir la diferenciación de eritroides y la acumulación de HSF2, como también la activación transcripcional de los objetivos de HSF2, como los genes *hs*. No se han caracterizado hasta la fecha los estímulos responsables de la activación de HSF4, pero evidencias obtenidas *in vitro* sugieren papeles opuestos para las dos isoformas HSF4, en la regulación de genes *hs*. (58).

Considerando las múltiples isoformas del HSF y la complejidad de sus funciones reguladoras, es de gran importancia la caracterización de los mecanismos responsables de la expresión y regulación de las distintas isoformas. Por ejemplo, se ha descrito la existencia de isoformas HSF1, pero no se ha explorado todavía si éstas poseen características diferentes o similares a las de los HSF2 y HSF3. El HSF3 de aves debe ser el único miembro de esa familia HSF, porque hasta la fecha sólo se ha encontrado un solo mRNA en vez de las múltiples isoformas alternativamente unidas. La localización cromosómica de los HSF es probable que esclarezca el *locus* HSF y el de los genes vecinos. Con ayuda de análisis genéticos a gran escala, con técnicas de *microarray*, pueden encontrarse nuevos e inesperados genes HSF.

Respecto a la conservación de la respuesta al estrés durante la evolución, es interesante anotar que se han encontrado dos especies acuáticas que carecen de respuesta inducible al calor: un pez teleosteo del antártico el *Trematodus bernachii* y la hidra de agua dulce la *Hydra oligactis*. Esta carencia se debe probablemente a la adaptación evolutiva a temperaturas inferiores a 0° C. (60, 61). La falta de respuesta al estrés implica la eliminación, bien de los genes *hs*, o de algún componente en la vía reguladora durante la evolución.

El análisis filogenético ha revelado inesperadamente que el HSF1 del pez cebra es más parecido a otros HSF1 de vertebrados que a los del pez sol de agallas azules. Esto indica que los peces pueden tener distintos HSF o que diferentes especies de peces tienen HSF divergentes. Como se supone que los múltiples HSF de los organismos superiores regulan de manera diferente la expresión génica en respuesta a diferentes señales, es posible que los peces posean diferentes tipos de HSF considerando la necesidad, de las muchas especies de estos seres acuáticos, de tolerar en su ambiente natural grandes fluctuaciones de temperatura y de otros parámetros fisicoquímicos. En apoyo a esta hipótesis, la complejidad de los HSF en plantas también parece ser mayor que en otros organismos eucariotas. En el tomate, por ejemplo, los HSF están codificados por una familia genética de hasta cinco miembros.

Los esfuerzos para identificar las proteínas que interactúan con los HSF son continuos. El clarificar las bases estructurales de la

regulación, mediada por fosforilación, de los HSF1 y de los otros HSF, es un tema de enorme importancia, ya que ha de proporcionar interesantes conocimientos sobre los mecanismos sensibles al estrés, y ayudará a comprender la significación de esta familia de factores de transcripción en la adaptación de los diversos ambientes biológicos a los cuales se encuentran expuestos los organismos.

2.2. Mecanismos de adaptación al estrés

La respuesta a situaciones de estrés ofrece un paradigma ideal para comprender de qué manera la célula reconoce y se adapta a situaciones adversas fisiológicas y ambientales. Como se mencionó anteriormente, una gran variedad de agresiones metabólicas tales como elevadas temperaturas, metales pesados, fármacos citotóxicos, privación de glucosa, diversos ionóforos del calcio, estrés oxidativo, infección vírica, análogos de aminoácidos y venenos metabólicos dirigidos hacia la generación del ATP, origina cambios similares en la expresión genética que conducen a la acumulación de las proteínas del estrés.

Este complejo mecanismo de defensa implica la inducción rápida de una serie de genes específicos que codifican proteínas citoprotectoras. En células de mamíferos la inducción de la síntesis de las HSP puede desencadenarse, no sólo por el calor sino también por una variedad de condiciones tóxicas que conducen a la acumulación de proteínas alteradas (no nativas). Muchos de los agentes/tratamientos que inducen una respuesta al estrés comparten una propiedad común, que es la de afectar de manera adversa la propia conformación y la función de las proteínas. Por consiguiente, se propuso primero y se demostró después, que en aquellas condiciones donde las proteínas anormalmente plegadas comienzan a acumularse en la célula, debe iniciarse una respuesta defensiva. Esta respuesta implica el incremento en la expresión de proteínas del estrés, las cuales han de facilitar la identificación, eliminación y/o restauración de las proteínas alteradas por el acontecimiento agresivo.

La activación de la transcripción de los genes *hs* se encuentra modulada también en condiciones fisiológicas que no dependen de

situaciones de estrés, como la progresión del ciclo celular durante el desarrollo y la diferenciación o por efecto de moléculas que regulan la proliferación celular. En células en proliferación se ha descrito un papel importante para el HSF3, no relacionado con la respuesta al estrés, por unión directa a la proteína c-Myb, un factor de transcripción implicado en la hematopoyesis y la proliferación celular, a través de sus respectivos dominios de unión al DNA (62). Como c-Myb se expresa y es necesario para la transición G1 → S del ciclo celular, simultáneamente con la HSP70, es admisible que la activación del HSF3 inducida por c-Myb, pueda contribuir a la expresión, dependiente del ciclo celular, de los genes *hs*. La interacción c-Myb-HSF3 se rompe por unión directa del supresor tumoral p53 al HSF3, lo que conduce a la degradación de c-Myb por el proteosoma y a la inhibición de la expresión de HSP70 y HSP90 (63). Las formas mutadas de p53 que aparecen en algunos tumores, no son capaces de inhibir la activación del HSF3 inducida por c-Myb, sugiriéndose la existencia de una interacción entre el producto del proto-oncogen c-Myb y el supresor tumoral p53 en la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Figura 3).

Los miembros de la familia HSP70 parece que juegan un papel directo en la autorregulación de la respuesta al estrés. En eucariotas superiores, el HSF1 se encuentra tanto en las células estresadas como en las no estresadas. En las no estresadas se expresa como un monómero inerte unido a la HSP70 y a otras carabinas moleculares, que carecen de actividad transcripcional (64). Los dominios de enlace al DNA y de activación transcripcional se encuentran reprimidos mediante interacciones intramoleculares y fosforilación de la serina.

¿De qué manera las células perciben un cambio en el ambiente (temperatura, etc) y activan el HSF1?

La agresión térmica o de cualquier otro tipo, origina la desnaturalización de las proteínas. Estas proteínas desnaturalizadas son la señal inicial para la inducción de la respuesta al estrés. Kauzmann (65) define la desnaturalización de las proteínas como «un proceso o secuencia de procesos en los que la disposición espacial de las cadenas de polipéptidos en la molécula, experimenta un cambio,

desde la configuración típica de la proteína nativa a una disposición desordenada». Esta definición es aún válida, aunque ya se conoce mucho más acerca de las estructuras desordenadas producidas por desnaturalización (66). Kushner propuso en 1977 (67) que la desnaturalización podía ser reversible o irreversible: «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 investigadas 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, bien a una espiral arbitraria o a un glóbulo derretido, dependiendo de las condiciones de desnaturalización (68). La desestabilización y desdoblamiento de las proteínas termolábiles origina estos intermediarios a modo de glóbulos derretidos con gran tendencia a la agregación. El estrés oxidativo origina la modificación de los tioles proteicos, debido a lo cual estas proteínas se despliegan y forman estructuras similares a las producidas por estrés térmico. A pesar de que los diferentes tipos de estrés causan la desnaturalización de diferentes proteínas, las proteínas sufren un modelo similar de desdoblamiento.

Por tanto, la señal de estrés es una consecuencia del flujo de proteínas desdobladas o parcialmente plegadas, las cuales, a su vez requieren la intervención de las carabinas moleculares HSP70 y HSP90. La intervención de estas carabinas sobre las proteínas antes citadas se requiere para que éstas recuperen su conformación funcional y se evite así la agregación de las proteínas a la que antes se aludía. En este proceso interviene la co-carabina Hdj1, (Figura 4) (58). Las carabinas, en condiciones normales, se encuentran en el citosol unidas al HSF1 inerte. Después de la señal de estrés, dichas carabinas se separan del HSF1 y son entonces secuestradas por las proteínas lesionadas (no nativas y no adecuadamente plegadas), que necesitan ayuda. Como consecuencia de la aparición de proteínas lesionadas y liberación de las carabinas unidas al HSF1, el HSF1 queda también libre y es el momento en el que se despreprime la actividad de enlace al DNA del HSF1. Los monómeros HSF1 así liberados pueden trasladarse al núcleo donde se oligomerizan y se fosforilan en los residuos de serina. Es en este estado cuando ad-

quieren la capacidad para unirse al HSE localizado en posición anterior a los genes *hs*, lo cual resulta en la inducción de la transcripción. La fosforilación inducible parece que es esencial para activar la transcripción. Como se comentó anteriormente, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, como la aspirina y la indometacina, promueven la translocación del HSF1, la trimerización del HSF1 y su unión al HSE, pero son incapaces de inducir la fosforilación del HSF1, lo cual conduce a un estado de unión HSF1 (trímero)-DNA transcripcionalmente inerte, donde no se detecta la expresión de los genes *hs* (55, 69, 70). Sin embargo, las células tratadas con los fármacos antes mencionados están sensibilizadas frente a posteriores exposiciones a situaciones de estrés térmico o de otra naturaleza. Está demostrado que las alteraciones de la fosforilación del HSF1 por exposición al ionóforo del calcio A23187, conduce a la inhibición de la expresión de los genes *hs* (64), mientras que la inducción de la fosforilación es un acontecimiento importante para la activación transcripcional. Se desconocen, hasta el momento, la(s) proteína quinasa(s) implicadas en esta fosforilación. La identificación de esta(s) quinasa(s) es un reto en el estudio de las vías señalizadoras que controlan esta actividad y ha de representar un gran avance en el conocimiento de la respuesta al estrés en mamíferos.

Así como la síntesis de las HSP se eleva proporcionalmente a la aparición de proteínas alteradas, la HSP70 y otras carabinas se van localizando en el núcleo y se van uniendo al dominio de transactivación transcripcional del HSF1 reprimiendo así la transcripción de los genes *hs*. La atenuación de la respuesta al estrés depende también de los efectos reguladores negativos de otra proteína, la proteína de enlace al HSF1 (HSBP1). Esta proteína se une a la región del HSF1 responsable de la trimerización del factor, lo que conduce a la disociación de los trímeros en su forma monomérica y al posterior repliegamiento del estado monomérico inerte, completándose así el ciclo del HSF1 (54).

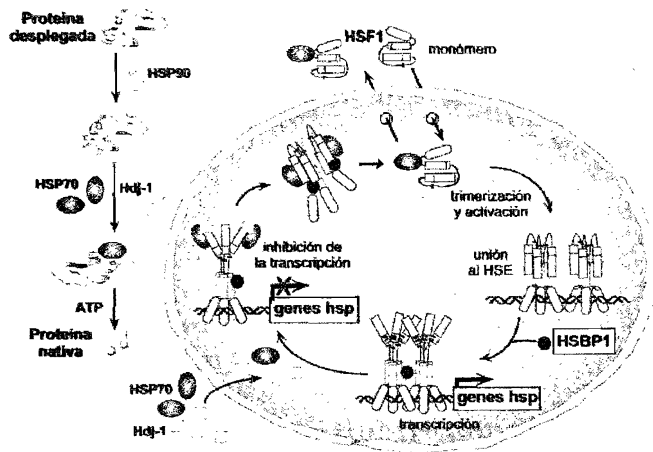


Figura 4. Regulación de la respuesta al choque térmico y ciclo del HSF. La activación del HSF1 va unida a la aparición de proteínas no plegadas y al requerimiento celular de la asistencia de las carabinas moleculares HSP90, HSP70 y Hdj-1, para prevenir la agregación de las proteínas anormalmente plegadas. El 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 *hsp*. 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 (64).

Termotolerancia adquirida

El desarrollo de una resistencia transitoria al choque térmico citotóxico fue descrito por primera vez por Gerner y Schneider en 1975 (71). 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 inducidos 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 (19, 72) encontró unos abultamientos «puffs» 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 Tissieres *et al.*, (73) observaron que los abultamientos cromosómicos inducidos por calor se debían a la mayor expresión de una serie de genes, los genes del choque térmico (*hs*). Los abultamientos cromosómicos son sitios donde tiene lugar la transcripción génica, y los causados por calor contienen los genes del choque térmico y sus transcritos o mRNA. Estos son los que han de dirigir la síntesis de las HSP 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, desde bacterias hasta los eucariotas superiores incluyendo células humanas. Los organismos utilizados con más frecuencia, además de la mosca *Drosophila*, han sido las levaduras, particularmente el

Saccharomyces cerevisiae, las bacterias como *Escherichia coli* y roedores tales como ratón y rata. Es mucho lo que se ha progresado desde la observación al microscopio de los abultamientos cromosómicos por Rittosa, hasta la caracterización bioquímica de muchas de las HSP: clonaje y caracterización de los genes y operones, manipulación de estos genes y el desarrollo del concepto de carabinas moleculares. La evolución de este concepto no está exclusivamente ligada al progreso realizado en el estudio de la respuesta al estrés y las HSP, sino que está también conectada con un cambio de ideas concerniente a cómo una proteína consigue una conformación funcional y la mantiene incluso en situaciones adversas.

Existen pruebas evidentes directas que atribuyen a la HSP70 el fenómeno de la termotolerancia. Estas evidencias proceden de estudios que demuestran la neutralización de la función de la proteína, por microinyección de anticuerpos específicos en fibroblastos, los cuales se vuelven extremadamente sensibles al calor (74). Se ha detectado también que la concentración de HSP70 en fibroblastos se relaciona con el grado de termotolerancia (75). Experimentos de transferencia genética han demostrado que las HSP27 y HSP110 son capaces de transferir termorresistencia.

Las células que han adquirido termotolerancia por tratamiento térmico están protegidas también frente a otros estímulos diferentes al calor, tales como TNF α , monocitos, luz UV y estrés oxidativo. Resultados obtenidos en diversas líneas celulares en las que se había inducido o reprimido la expresión de la HSP70, demuestran que esta carabina es una proteína de supervivencia general, capaz de mediar la mayor parte de la citoprotección inducida por calor. Además eleva la resistencia celular frente a casi todos los agentes apoptogénicos o necrogénicos. Sin embargo, la agresión de las células asesinas activadas por linfoquinas, el receptor de muerte FAS y las radiaciones ionizantes, pueden sobrepasar la protección mediada por la HSP70 (76).

También la HSP70 transferida por virus, protegió a las células neuronales del calor y de la isquemia, pero no de la apoptosis inducida por eliminación de un factor del crecimiento neuronal (NGF) (77). Es interesante destacar que la HSP27 se muestra efectiva en al-

gunos de los modelos apoptóticos no afectados por la HSP70, antes mencionados (eliminación del NGF y apoptosis mediada por FAS). Por tanto, la inducción combinada de ambas HSP70 y HSP27 ha de proteger las células de casi todos los estímulos de muerte con una excepción, las células asesinas activadas por linfoquinas.

La trehalosa se ha considerado como una carabina química ya que contribuye a la termotolerancia en levadura. Los mutantes de levadura que carecen de algún enzima de la biosíntesis de trehalosa son 500 veces más sensibles al estrés térmico (78). La trehalosa estabiliza a las proteínas frente a la desnaturalización por calor y previene la agregación de proteínas estabilizadas en una forma plegada parcialmente a modo de glóbulo derretido. Otros compuestos como el glicerol, la trimetilamina N-óxido y el dimetilsulfoxido actúan también como carabinas químicas inhibiendo la isoforma priónica PrP^{Sc} y estabilizando la proteína celular prión en su conformación no patogénica (79).

Es un hecho conocido, que existe una relación entre el estrés oxidativo y la inducción de los genes *hs*. Para definir esta relación nuestro grupo de investigación ha estudiado, en hepatocitos en cultivo, los efectos de la ciclosporina (CsA), cuyo metabolismo hepático induce estrés oxidativo, sobre los niveles de la carabina HSP70 (80). Cuando los hepatocitos de rata se incubaron en presencia de CsA la producción de especies reactivas de oxígeno se elevó notablemente, debido no sólo al metabolismo de la CsA, sino también porque este fármaco bloquea el «poro de permeabilidad transitoria» lo que implica la acumulación de Ca²⁺ mitocondrial y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. En nuestros experimentos con vitamina E, observamos un descenso significativo en la acumulación de peróxidos que fue paralelo al descenso de citotoxicidad y a la mayor la expresión de la HSP70. Así que, la CsA, a través de su metabolismo y acción genera importantes cantidades de ROS, las cuales inducen un incremento en la expresión de la HSP70. La relación entre la HSP70, una proteína endógena protectora inducida en respuesta a las ROS, y la vitamina E, un antioxidante exógeno que bloquea la acción de las ROS, puede considerarse como una competición por las ROS. La HSP70 y otras HSP son importantes por su capacidad para elevar la resistencia al estrés oxidativo inducido, en este caso,

por el metabolismo de la CsA. De estos resultados se deduce que la generación de peróxidos y la citotoxicidad inducidas por CsA se acompaña por la inducción de la expresión génica de la HSP70 y que la citotoxicidad de la CsA disminuye en presencia de vitamina E, de forma paralela a la desaparición de la HSP70 y a un incremento de la apoptosis (80, 81)

Con el objeto de comprobar si el efecto protector de la HSP70 podía contrarrestar el efecto apoptogénico del factor de crecimiento transformante alfa ($TGF\beta$), recientes experimentos de nuestro grupo han demostrado, que en hepatocitos de rata pretratados a 43° durante 20 minutos, se elevó la resistencia de estas células frente a la apoptosis inducida por el $TGF\alpha$. Esta resistencia estuvo acompañada por una elevación de la expresión de la HSP70 y de los sistemas antioxidantes endógenos y por una disminución de los niveles intracelulares de ROS (82).

3. 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 clases de 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 (83). 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 recalcada por su conservación evolutiva.

Hace casi 30 años que Anfinsen demostró 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 (13). A este principio fundamental de la biología ha habido que añadirle un detalle importante, y es que, para conseguir *in vivo* 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 auxiliaoras, o *carabinas moleculares*, para que se verifique una serie de procesos tales como, el plegamiento adecuado, el ensamblaje de las subunidades, el transporte y la degradación de las proteínas. Las carabinas moleculares son familias de proteínas, abundantes y ubicuas, muchas de las cuales son proteínas del estrés, 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 elevan el rendimiento de las reacciones de plegamiento y ayudan a la recuperación celular después de una agresión. También pueden conducir al desdoblamiento de las proteínas alteradas irreversiblemente en un proceso encaminado hacia su degradación. A pesar de estas características comunes, la estructura y modo de acción de las diferentes carabinas es muy diverso. Algunas familias son muy específicas en su acción, mientras que otras no. Algunas, no todas, utilizan la unión e hidrólisis del ATP para controlar la liberación y la unión a las proteínas que constituyen sus sustratos.

El término *carabinas moleculares* (*molecular chaperones*) fue usado por primera vez por el grupo de Laskey (84) 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 impidiendo la agregación. Esto lo realizan las carabinas moleculares sin formar ellas mismas parte del nucleosoma y sin especificar la estructura nucleosómica (85).

Según Ellis, de la Universidad de Warwick del Reino Unido (15), 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, 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, muy apropiado para describir proteínas que impiden interacciones incorrectas entre partes de otras moléculas, pero que no proporcionan informa-

ción estérica ni forman parte de las estructuras funcionales finales. Este mismo autor en otro artículo (86), insiste en la definición de las carabinas moleculares como la de un gran y diverso grupo de proteínas no relacionadas entre sí, que comparten una propiedad funcional, la de asistir al plegamiento o al desdoblamiento de estructuras proteicas, pero que no son componentes permanentes de estas estructuras cuando ellas llegan a realizar sus funciones biológicas normales.

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 también 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 molécula sea considerada una carabina molecular, tiene que cumplir las dos condiciones siguientes:

1. Asistir al plegamiento (unión no covalente) o desdoblamiento de estructuras proteicas
2. 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. Unas carabinas lo son y otras no, como tampoco es una propiedad universal de estas carabinas la de hidrolizar el ATP.

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.

La DnaK (HSP70, BiP) es el homólogo bacteriano en el *Escherichia coli*, de una gran e importante clase de carabinas presentes en el citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y cloroplastos (87). Actúa concertadamente con la DnaJ (implicada en la unión al sustrato y presentación), la GrpE (un factor de intercambio nucleotídico). Las estructuras cristalinas de los dos dominios ATPasa, que se relacionan estructuralmente con la actina y la hexoquinasa, están separadas del dominio de enlace al sustrato (88). El dominio de enlace al sustrato muestra un dominio en forma de ladrillo con un agujero a través del cual el péptido avanza. Se ha propuesto que una hélice- α que se desliza a través de la parte superior de este agujero actúa a modo de tapadera con bisagra que permite la entrada y la salida del segmento de la cadena polipeptídica que se une en una conformación completamente extendida. La unión e hidrólisis del ATP controlan la liberación y unión al sustrato por un mecanismo poco conocido en que están implicadas interacciones entre los dos dominios y la DnaJ.

En contraste con los ejemplos previos, la HSP60 (GroEL, cpn60) forma una estructura parecida a una gran jaula con dos anillos de siete subunidades de 60 kDa, que rodean una cavidad central. El intermediario proteico que tiene que plegarse, se une a los sitios hidrofóbicos que tapizan estas cavidades. La familia HSP100 posee también una estructura de anillo hexamérico (89, 90) y parece que el sustrato desdoblado se une a su cavidad central.

Es interesante comparar los diferentes modos de unión al sustrato proteico en algunas de las carabinas más conocidas. La diversi-

dad de las interacciones entre carabina y polipéptido se ilustran en las figuras 5 y 6. Las HSP de peso molecular bajo son las que poseen mayor capacidad de unión al sustrato (91). Las proteínas desnaturalizadas parece que se unen cubriendo la superficie o quizás siendo encerradas dentro de una cavidad formada por las subunidades de las HSP. Esta última posibilidad requiere la asociación y disociación de los oligómeros HSP. Esta clase de HSP parece que no posee actividad ATPasa y actúa en respuesta al estrés celular, como un enlazador pasivo de las proteínas alteradas (92, 93).

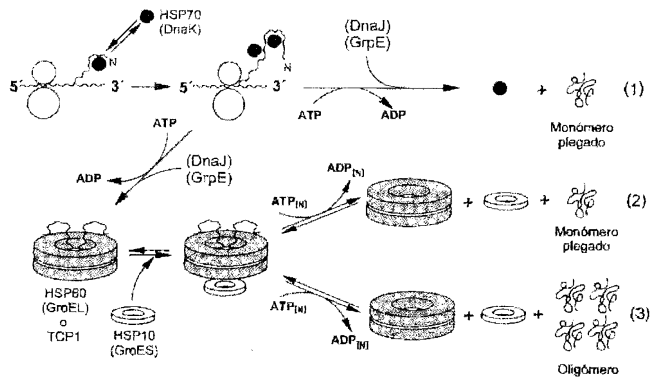


Figura 5. Modelo de plegamiento y ensamblaje asistido por carabinas moleculares. Durante la síntesis proteica la HSP70 (DnaK) interacciona con la cadena polipeptídica nascente a medida que va emergiendo del ribosoma. Tal interacción previene el plegamiento prematuro e incorrecto con componentes de la maquinaria traduccional. (1) Para algunas proteínas el plegamiento comienza una vez liberada la cadena polipeptídica completa de la carabina HSP70 y no requiere la asistencia de ningún otro componente. (2) Otras proteínas una vez finalizada su síntesis son transferidas desde HSP70 (DnaK), con el concurso de DnaJ (GrpE), a la carabina HSP60, (GroEL o TCP-1). El plegamiento del polipeptido se verifica en el interior de la cavidad de la HSP60, por sucesivos pases de unión y liberación del sustrato acoplados a hidrólisis de ATP. (3) La HSP60 puede también participar en el ensamblaje de aquellas proteínas que forman parte de estructuras homo o heterodiméricas (2).

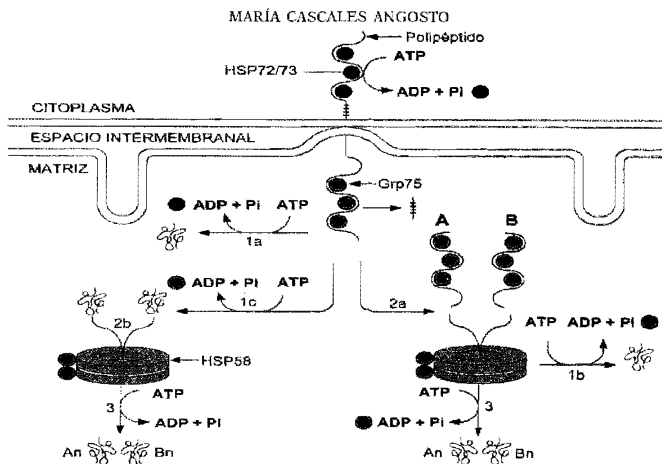


Figura 6. Modelo que describe el transporte de proteínas a la mitocondria, su plegamiento y ensamblaje. Las proteínas recién sintetizadas, con destino a la mitocondria, se mantienen en el citoplasma, en forma desdoblada competente para su traslocación, merced a su interacción con la HSP72/73. La traslocación del polipéptido a la mitocondria se acompaña por la liberación de la HSP72, dependiente del ATP. A medida que el polipéptido desdoblado entra en la mitocondria, se va uniendo a Grp75 a la vez que se elimina, por acción de una peptidasa, la secuencia señalizadora mitocondrial. (1a) Una vez en el interior de la mitocondria comienza el plegamiento que se acompaña por la liberación de Grp75, dependiente de ATP. (1b) Para algunas proteínas mitocondriales monoméricas el plegamiento requiere una interacción con HSP58. (1c) Para el ensamblaje de proteínas oligoméricas, la Grp 75 ha de liberarse del monómero. (2b) El monómero entonces se dirige hacia HSP58 y (3) se agrupa en su forma oligomérica. Alternativamente, (2a) el monómero, aún unido a Grp75 se mueve hacia HSP58 y (3) se agrupa en su forma oligomérica (2).

Algunas de estas ATPasas se asocian con proteasas y juegan un papel en la degradación proteica y en la termotolerancia y tienen la capacidad de disociar agregados proteicos. La expresión de la HSP104 de levadura a niveles normales, es necesaria para la conversión y el

mantenimiento del fenotipo psi+, un fenómeno priónico que implica la agregación del factor de traducción-terminación sup35 (94). La HSP90 interactúa con una serie amplia de receptores de esteroides y quinasas, por un mecanismo aún no determinado. La estructura cristalina del dominio N-terminal ha revelado un sitio de enlace al ATP y una inesperada similitud al plegamiento de la DNA-girasa (95).

Entre las carabinas más específicas se incluyen las proteínas del retículo endoplásmico calnexina/calreticulina, que se unen a oligosacáridos específicos y representan el control de calidad en el procesamiento de las glicoproteínas (96), y las peptidil-prolil isomerasa y proteína disulfuro isomerasa, que catalizan, respectivamente, la isomerización *cis-trans* de residuos de prolina y la isomerización de enlaces disulfuro. Estos enzimas son potencialmente el factor limitante en el proceso de plegamiento y se conocen varios ejemplos en los cuales son necesarias sus actividades para el éxito del plegamiento proteico (97, 98). Finalmente, se ha observado que las pro-secuencias de ciertas proteínas, actúan como carabinas intramoleculares, facilitando la adquisición del estado nativo antes de ser eliminadas por el procesamiento de liberación de la proteína activa (99). Este es un caso de catálisis específica de una etapa de plegamiento, ya que posiblemente la pro-secuencia ha surgido para estabilizar el estado de transición en la reacción de plegamiento de la cadena proteica principal. Esto difiere completamente del concepto general de carabina molecular, donde no es probable la estabilización de los estados de transición en un amplio rango de sustratos con plegamientos diferentes.

La agregación es un fenómeno que se origina porque algunas proteínas se pliegan vía intermediarios compactos que exponen residuos hidrofóbicos sobre sus superficies. La actividad termodinámica de estos intermediarios compactos se eleva 2 o 3 órdenes de magnitud por el efecto de las elevadas concentraciones de proteínas y ácidos nucleicos dentro de la célula (340 mg/ml en el caso del *Escherichia coli*) (100). En el caso de las carabinas HSP60 (denominadas chaperoninas), estas circunstancias incluyen el secuestro de las cadenas parcialmente plegadas en el interior de complejos oligoméricos en forma de rosca, donde se continúa el plegamiento hasta un punto donde la agregación ya no supone problema. En el caso de las

HSP70 (DnaK y DnaJ) las superficies hidrofóbicas expuestas del polipéptido se protegen hasta que la estructura primaria se pliega en un dominio.

La evolución de las carabinas moleculares y su papel catalizador sobre el plegamiento proteico es paralelo al desarrollo de un organismo complejo.

3.1. 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 la 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 (101, 102).

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 reorganización de los enlaces disulfuro en las proteínas secretoras y la isomerización cis-trans de los enlaces peptídicos que preceden a los residuos de prolina, respectivamente (103, 104)

Breve historia

El estudio pionero de Anfinsen y Harber en 1961 (105), sobre re-naturalización de la ribonucleasa pancreática bovina a su forma de enzima nativa biológicamente activa, por reoxidación *in vitro* (después de la reducción de los puentes disulfuro y de la disrupción de la estructura terciaria), 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, todavía válida, 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».

La historia del plegamiento proteico, sin embargo, viene de más lejos, cuando Chick y Martin, en 1911 (106), encontraron que las proteínas podían ser desnaturalizadas *in vitro* y de esta manera descubrieron los procesos de la agregación de las proteínas. En 1929, Wu (107) postuló que la desnaturalización era un proceso de desdoblamiento y que las estructuras de las proteínas nativas funcionales implicaban diseños regulares y repetidos de plegamiento en una red tridimensional. Anson y Mirky, en 1931 (108), y posteriormente Anson en 1945 (109), demostraron que el plegamiento de la hemoglobina era reversible y que la hemoglobina podía ser renaturalizada *in vitro* a una forma que tenía el espectro de absorción, la unión al oxígeno y un modelo de digestión, similares a los de la proteína nativa funcional. Posteriores estudios de Eisemberg y Schwert (110) y de Schellman (111) demostraron que la desnaturalización y la renaturalización son procesos termodinámicos, que implicaban un cambio en energía libre y grandes cambios en la conformación entre los estados desnaturalizado y el nativo (112).

Estas primitivas investigaciones pusieron de manifiesto que los procesos llevados a cabo en los tubos de ensayo podían reconstituir estructuras proteicas nativas funcionales, pero 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 algunas proteínas poseedoras de multidominios podía durar varias horas, y está claro que todas las conformaciones posibles no podían ser aprobadas como estructuras nativas. Levinthal (114) 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.

Los experimentos para examinar 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. Los resultados indicaron que el plegamiento proteico podía estar facilitado por proteínas ubicadas en el retículo endoplásmico de las células eucariotas. En el caso de proteínas que contienen enlaces disulfuro, el enzima clave implicado parecía ser la proteína disulfuro isomerasa.

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 sólo en presencia de proteínas adicionales, que no eran 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 (115). La HSP70 de mamíferos se demostró que 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 (101, 116).

Sólo se ha estudiado en detalle el plegamiento intracelular de unas pocas proteínas. Entre ellas está la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana (hCG- β), cuya cinética de plegamiento se muestran en el diagrama de la figura 7 (85)

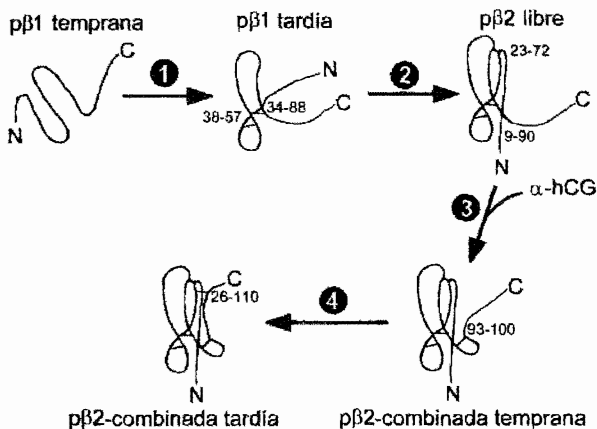


Figura 7. Modelo del mecanismo de plegamiento de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana (hCG- β). Estudios cinéticos intracelulares han indicado que la hCG- β recién sintetizada en el interior de la célula (*proteína β temprana*), se convierte en un intermediario (*proteína β tardía*) que 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- β -tardía sufre un gran cambio conformacional en proteína- β -libre ($t_{1/2} = 4-5$ min). Cuando se forma el puente disulfuro 93-100 la proteína- β -libre se convierte en un intermediario competente ($t_{1/2} = 8-10$ min) que después de la asociación con la subunidad α se reconoce como *proteína β 2 combinada*. Después del ensamblaje del heterodímero el enlace 26-100 forma un cinturón alrededor de la subunidad α (84).

Existe cada vez más interés en investigar los mecanismos que regulan el plegamiento *in vivo* de las proteínas de mamíferos, debido al número de enfermedades humanas conocidas que se relacionan con defectos en este plegamiento (117, 118). Estas incluyen la fibrosis quística, la deficiencia de α 1-antitripsina, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeld-Jacob, y enfermedades degenerativas tales como la enfermedad de Huntington y el cáncer.

Muchas de las proteínas eucariotas cuyo plegamiento y ensamblaje se han estudiado *in vivo* son proteínas de membrana o secretadas. Ellas siguen una ruta similar hacia la superficie celular, que se puede resumir en las siguientes etapas:

1. Síntesis en el retículo endoplásmico;
2. Traslocación de la proteína naciente hacia el espacio cisterna del retículo endoplásmico, donde el péptido señalizador se divide. Se verifica el plegamiento inicial co-traduccional implicando la estructura secundaria y alguna estructura terciaria nativa. Para las glicoproteínas tiene lugar la N-conexión de oligosacáridos ricos en manosa y el procesamiento inicial de las cadenas de oligosacáridos. Se verifica la formación de puentes disulfuro y para las proteínas multiméricas se logra la oligomerización o el ensamblaje de las subunidades, a la vez que la estructura nativa funcional;
3. Las proteínas destinadas para la superficie celular o la secreción se traslocan al aparato de Golgi, se procesan posteriormente, y desde allí se transportan a la superficie celular o se empaquetan en vesículas secretoras.

El papel de las carabinas moleculares en el plegamiento, ensamblaje y traslocación celular de las proteínas, ha sido objeto de revisiones recientes (8, 101, 119). Las carabinas del retículo endoplásmico juegan un papel fundamental en el plegamiento y control de calidad de las proteínas, mientras que las carabinas del citosol lo juegan en el plegamiento, transporte y actividad biológica de una serie de proteínas que van a ser transportadas a orgánulos específicos como el núcleo o la mitocondria. Miembros importantes de la familia de carabinas del retículo endoplásmico incluyen la proteína

BiP, caracterizada originalmente como una proteína de unión a inmunoglobulinas (de ahí su nombre), las Grp 72, Grp94, la calnexina y la calreticulina, etc.

Las carabinas actúan de manera secuencial en el mecanismo de plegamiento proteico, uniéndose a los intermediarios que se encuentran en diversos estados de plegamiento que, pasan de una carabina a otra o a un complejo de carabinas en cascada, liberando la proteína nativa competente. La unión se realiza por interacción de las carabinas con los residuos hidrofóbicos de la superficie de las proteínas no plegadas y la liberación implica a menudo la hidrólisis del ATP. La unión de las carabinas no implica un consenso específico de aminoácidos en la proteína sustrato, sino que se determina por la disposición de los residuos hidrofóbicos. La unión de BiP con los intermediarios está favorecida por la secuencia de los residuos de aminoácidos en 7-8 con los residuos de aminoácidos alifáticos y aromáticos en posiciones alternantes. Estos son los modelos de secuencias que estarían normalmente en el interior de las proteínas nativas, proporcionando una vía para que las carabinas puedan discriminar entre proteínas plegadas y no plegadas.

La observación de que las carabinas son necesarias para ayudar al plegamiento proteico en las células vivas no niega los descubrimientos de Anfinsen y Haber en 1961 anteriormente mencionados (105), que describen que las proteínas pueden plegarse espontáneamente de acuerdo con su secuencia de aminoácidos ¿Por qué, entonces existen las carabinas y por qué las células las necesitan?

La mejor evidencia de los mecanismos que implican a las carabinas en el plegamiento proteico procede del *Escherichia coli* donde las carabinas DnaJ/DnaK y las GroEL/GroES actúan concertadamente en el plegamiento. GroEL está formada por 14 subunidades idénticas que forman dos anillos heptaméricos con una hendidura en el centro, que puede acomodar proteínas de hasta 60 kDa. GroES es una estructura en anillo que comprende siete subunidades de 10 kDa, que forma una especie de tapadera sobre GroEL y cuya misión es sostener un intermediario en proceso de plegamiento dentro de la hendidura de GroEL. El plegamiento se verifica en la hendidura de GroEL e implica la unión al ATP y la hidrólisis, la liberación y el

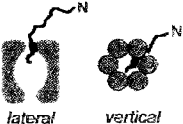



carabina	topología de enlace	acción
HSP100	 <p>lateral vertical</p>	Desagregación dependiente de ATP y despliegue para la degradación
HSP90	Complejo multiproteico	Maduración conformacional de receptores de hormonas esteroideas y quinasas transductoras de señales
HSP70(DnaK)		Estabilización dependiente de ATP de regiones hidrofóbicas en segmentos polipeptídicos extendidos
HSP60 (GroEL)		Facilitar dependiendo del ATP el plegamiento hacia el estado nativo
HSP pequeñas		Estabilización frente a la agregación durante el choque térmico
calnexina/calreticulina	?	Plegamiento de proteínas glicosiladas en el RE en cooperación con la glucosiltransferasa

Figura 8. Topología de la unión de polipeptidos y familias de carabinas. Las líneas significan los polipeptidos y los segmentos más gruesos indican los sitios de unión a las carabinas de carácter típicamente hidrofóbico (82).

replegamiento de las proteínas incompletamente plegadas dentro de la hendidura GroEL, hasta que la mayoría de las proteínas están plegadas y en su estado nativo funcional. Los miembros de las familias HSP70 y HSP40 de carabinas en *Escherichia coli*, las DnaK y DnaJ, respectivamente, se encuentran implicados en la unión inicial

de los polipéptidos recién sintetizados por el ribosoma. Estas carabinas asisten en las etapas iniciales del plegamiento proteico y pueden facilitar, en cooperación con el factor de intercambio de nucleótidos, el GrpE, el plegamiento completo hacia el estado nativo de proteínas. Algunas proteínas requieren acciones adicionales de GroEL y GroES

La maquinaria HSP70 de carabinas moleculares

Las HSP70 pertenecen a una familia de ATPasas muy conservadas, de masa molecular cercana a los 70 kDa, que se encuentran en procariotas y en la mayoría de los compartimentos de las células eucariotas. La estructura tridimensional de las HSP70 se conoce sólo en parte. La HSP70 se encuentra subdividida en un dominio N-terminal ATPasa de 45 kDa, seguido de un segmento de unos 18 kDa que contiene el sitio de unión del péptido sustrato (SBD) y un segmento más variable de unos 10 kDa (Figura 9). El dominio ATPasa es similar al del monómero de la actina G globular y transmite los cambios conformacionales, dependientes del ATP, al dominio C-terminal de unión al péptido. El dominio ATPasa de la DnaK, *Escherichia coli*, interacciona con el factor intercambiador de nucleótidos de 22 kDa, el GrpE. La DnaJ puede también unirse al dominio ATPasa. El dominio de enlace al péptido de HSC70 consiste en dos estructuras beta antiparalelas y una hélice alfa.

Una característica clave de la acción de la HSP70 es su reversible unión y liberación de moléculas sustrato, que se acoplan a un ciclo de hidrólisis del ATP y a cambios conformacionales (120). La actividad ATPasa intrínseca de la HSP70 es muy débil, pero las etapas del ciclo ATPasa están reguladas por interacción con una serie de proteínas de otros tipos. En particular, miembros de la familia de HSP40 de cocarabinas, estimulan la reacción ATPasa, mientras que la presencia de otra serie de proteínas accesorias atenúa el recambio ADP-ATP, y otras actúan como factores reguladores tales como la familia BAG1 (Figura 9).

Las cocarabinas HSP40 se definen por una secuencia de 70 aminoácidos conocida como el dominio J. Los miembros específicos de

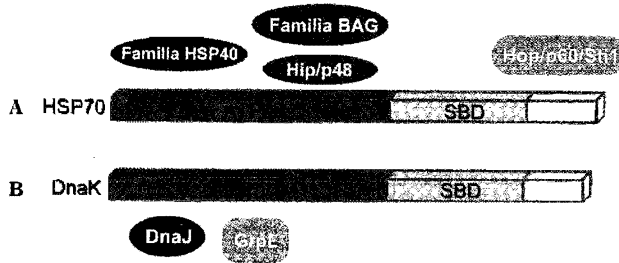


Figura 9. Dominios típicos y factores reguladores (A) de una HSP70 eucariota, (B) de la DnaK de *E. Coli*. Ambos tipos de HSP70 poseen un dominio aminoterminal ATPasa de 45 kDa, un dominio SBD de unión al sustrato y un dominio carboxiterminal de 10 kDa, de función desconocida (120).

la familia HSP70 están acompañados por HSP40, es decir que sólo ciertos miembros de la familia HSP40 pueden interaccionar funcionalmente con proteínas HSP70 específicas, bien como resultado de su localización en el mismo compartimento subcelular o por algún mecanismo poco conocido que confiere especificidad de reconocimiento.

La maquinaria de carabinas moleculares HSP70 es esencial para una gran variedad de procesos: plegamiento proteico, unión y desunión de oligómeros, degradación proteica y traslocación (83). La versatilidad de las HSP70 proviene de su función básica, que es unirse y liberar segmentos hidrofóbicos de una cadena polipeptídica desdoblada en una reacción cíclica dependiente de la hidrólisis del ATP. Mediante un proceso reiterativo de unión y disociación de los dominios peptídicos, la HSP70 impide la agregación de los intermediarios polipeptídicos. Las HSP70 contienen un dominio ATPasa N-terminal y un dominio C-terminal más variable de unión al péptido. Al comienzo de un ciclo, las proteínas sustrato se unen reversiblemente al complejo HSP70-ATP. La hidrólisis del ATP induce un cambio conformacional, que eleva la afinidad de la HSP70 por su sustrato, hasta formar un complejo estable sustrato-HSP70-ADP (121). Todas las HSP70 co-

nocidas poseen una co-carabina del tipo DnaJ (HSP40) o una proteína asociada con las características de estas proteínas, denominada dominio J, que modula las interacciones con HSP70. La co-carabina DnaJ coopera en el ciclo HSP70 estimulando su baja tasa intrínseca de hidrólisis del ATP. De esta manera, si DnaJ se coloca en la proximidad de un sustrato, la interacción transitoria débil entre el polipéptido desdoblado y el complejo HSP70-ADP se convierte en una unión estable polipéptido-HSP70-ADP. En bacterias y en la matriz mitocondrial, aparece un tercer componente, la subunidad reguladora GrpE, la cual recicla a la HSP70 estimulando el recambio del ADP por el ATP. Una vez realizado el recambio de nucleótidos, el complejo HSP70-ATP se separa de la proteína sustrato.

La distribución espacial de las co-carabinas es crítica para la coordinación de la función de la HSP70. Las co-carabinas aseguran que las sustancias se unen y se liberan en un lugar y tiempo apropiados para regular el ciclo ATP de las HSP70. Se han propuesto dos modelos para explicar la función de la HSP70 orgánular en la traslocación proteica (Figura 10). El polipéptido se difunde espontáneamente a través del canal. Cualquier péptido que aparezca en el sitio trans del canal se asocia con la HSP70 del lumen. La hidrólisis del ATP le sirve para unirse fuertemente al péptido e impedirle la marcha atrás. La HSP70 funciona así permitiendo al péptido moverse solo en una dirección. Como cada segmento adicional traslocado ha de ser atrapado, este modelo presupone que se necesitan varias moléculas de HSP70 para importar un solo polipéptido precursor. La presencia de dominios plegados en el polipéptido o una fuerte interacción entre éste y las paredes del canal, desequilibraría el proceso de transporte. Un modelo alternativo, pero no mutuamente exclusivo, es que la HSP70 se une al polipéptido y lo empuja activamente, ejerciendo fuerza sobre el canal. Este modelo requiere que la HSP70 se inserte transitoriamente en el lado trans del canal (Figura 10) (121).

Recientemente Park y colaboradores (122) han estudiado la función de la HSP72 como proteína natural inhibidora de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK). Esto añade una nueva dimensión a esta carabina, que la involucra en la modulación de la señalización activada por estrés, mediante inactivación directa de la JNK y con ello de su capacidad apoptogénica. Ciertas situaciones de estrés como el térmi-

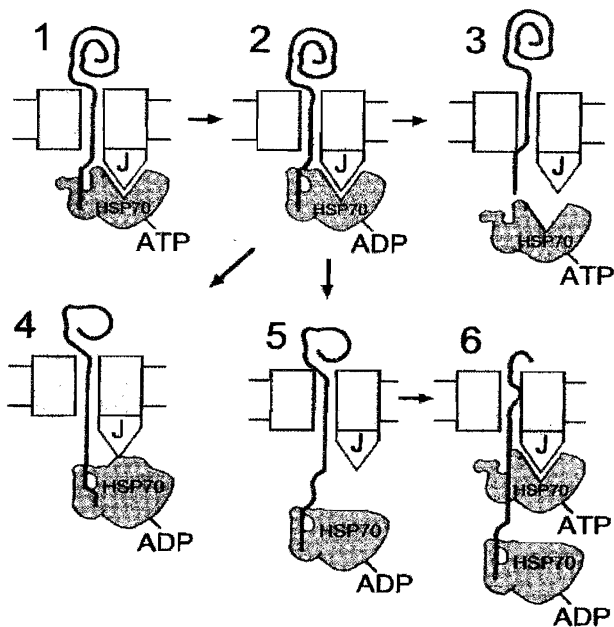


Figura 10. HSP70 y traslocación polipeptídica. (1) El complejo HSP70-ATP se recluta en el canal de traslocación por una proteína que contiene un dominio J, o un segmento relacionado con J. (2) La proteína J estimula la hidrólisis del ATP por la HSP70, lo cual cambia la conformación de HSP70 y le permite unirse fuertemente al polipéptido, impidiendo que se deslice hacia atrás. (3) La marcha atrás del polipéptido es posible si la HSP70 lo libera después del espontáneo intercambio de nucleótidos inducido por GrpE. (4) Un cambio conformacional más notable de HSP70 le hace «empujar» y desdoblarse parte del polipéptido. (5 y 6) El complejo HSP70-ADP permanece unido al polipéptido y se verifica una difusión a través del canal. Una segunda HSP70 tiene que ser reclutada por la proteína J para «atrapar un segundo dominio peptídico» (121).

co y el oxidativo, activan la JNK, lo cual, a su vez, induce la expresión de la HSP72. La HSP72 es la que protege a las células de la citotoxicidad. Los resultados de Park (122) muestran que la HSP72 suprime la activación de la JNK al unirse directamente a esta quinasa, lo que sugiere un mecanismo inhibitorio «feedback» para la regulación de la vía señalizadora JNK en respuesta al estrés.

HSP90 y plegamiento proteico

La HSP90 es una de las carabinas moleculares más abundantes en la célula eucariota. Miembros de la familia HSP90 se encuentran en el citosol y en el retículo endoplásmico y su función es la de actuar como carabinas moleculares en el plegamiento de una serie definida de proteínas entre las que se incluyen los receptores de las hormonas esteroideas y las quinasas. Es una de las proteínas citosólicas más abundantes en los eucariotas significando de un 1 a un 2 % de las proteínas citosólicas totales en condiciones fisiológicas normales. En respuesta al estrés su expresión puede elevarse hasta 15 veces (123). Las HSP90 forman parte del poderoso entramado de carabinas que combaten las deletéreas consecuencias del desdoblamiento de las proteínas causado por condiciones no fisiológicas. A diferencia de otras proteínas del estrés, la HSP90 es una carabina dedicada sólo a unas pocas proteínas, tales como los receptores de las hormonas esteroideas y las quinasas del ciclo celular. En este aspecto, se han identificado como sustratos de la HSP90, diversas proteínas clave reguladoras, como los receptores de esteroides, las quinasas del ciclo celular y la p53. Recientemente se ha demostrado, que la HSP90 es el único objetivo de la geldamicina, un nuevo y potente fármaco antitumoral que bloquea la proliferación celular. Además de jugar un papel importante en la regulación conformacional de moléculas señalizadoras clave, la HSP90 citosólica puede contribuir a la homeostasis proteica en situaciones fisiológicas normales y de estrés.

En una reciente revisión, Young, Moarefi y Hartl (124) aportan nuevos datos sobre la función de la HSP90 indicando que la mayoría de los sustratos conocidos son proteínas señalizadoras. Estos sustratos dependen de la HSP90 para su maduración y mantenimiento conformacional. La disminución de la función HSP90 por mutacio-

nes o tratamiento con inhibidores (ansamicinas), produce múltiples defectos fisiológicos en las células vivas, consistentes en la falta de contribución de la función HSP90 en el entramado señalizador. Por ejemplo, en la regulación de la división celular, la sola alteración de la HSP90, afecta a muchas etapas de la cascada señalizadora mitogénica, a la progresión a través de G1 y G2 dependiente de ciclina, y a la función del centrosoma durante la mitosis.

La HSP90 posee una estructura modular en la cual dos regiones bien conservadas se encuentran conectadas por un eslabón de longitud variable que posee una elevada carga (Figura 11) La proteína

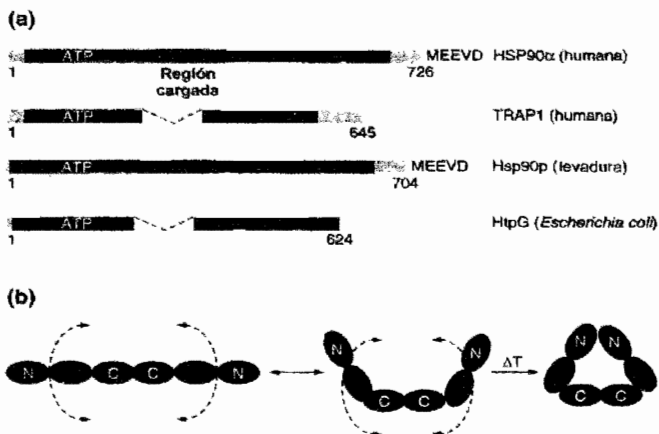


Figura 11. Estructura de la HSP90. (a) Las regiones más conservadas en las diferentes especies se muestran en rojo y azul. La longitud de la región cargada es variable y esta región falta en los procariontes y algunos eucariotas. La posición del dominio de unión al ATP se muestra cercana al extremo N. (b) Representación de la flexibilidad del dímero de HSP90. La formación del dímero ocurre mediante la asociación antiparalela de los dominios carboxi-terminales. La orientación de los dominios permite a la HSP90 adoptar diferentes conformaciones. Un incremento de la temperatura (ΔT) conduce a la conformación cerrada. MEEVD pentapéptido en el dominio carboxi-terminal muy conservado en la mayoría de las especies (123)

nativa es un dímero alargado cuyos sitios de asociación se sitúan en la región del extremo C-terminal de la proteína, que al parecer se encuentran en el centro, mientras que los dominios N-terminales se localizan en los extremos del dímero. Este dímero es bastante flexible, porque han podido detectarse diferentes formas de la molécula, que recuerdan la flexibilidad conformacional de los anticuerpos. El movimiento de los dominios, alrededor de una región bisagra, debe ser la base de este ordenamiento molecular. El choque térmico desencadena una transformación estructural adicional y específica en la HSP90 que coloca los dominios N-terminales en cercana proximidad (123).

La estructura tridimensional de los fragmentos N-terminales de la HSP90 humana han sido revelados por cristalografía de rayos X. El dominio consiste en 8 ramales antiparalelos de láminas β y nueve hélices α que forman un sandwich $\alpha\beta$ (Figura 12).

La estructura completa del dominio, incluyendo la geometría del sitio de unión al ATP, es similar a la de la DNA girasa B, una DNA topoisomerasa dependiente de DNA. En la HSP90, el sitio de unión del ATP se localiza en una abertura de 15 Å de profundidad; la lámina β descansa en el fondo de la abertura donde hélices y lazos

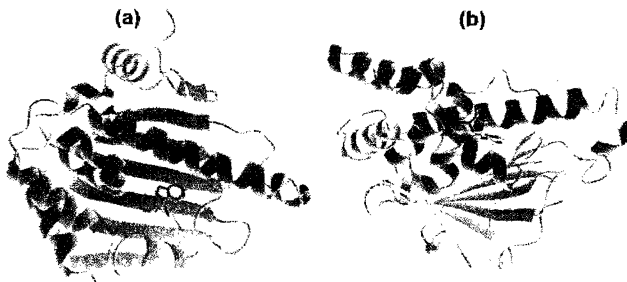


Figura 12. (a) y (b) Estructura del dominio N-terminal de unión al ATP de la HSP90 de levadura en dos orientaciones diferentes (123).

rodean el ligando. No se han revelado aún cambios en las estructuras cristalinas inducidas por la unión al nucleótido, excepto para la reorientación de la cadena lateral de un residuo de lisina (123)

La HSP90 está presente en el citoplasma de las bacterias, levadura y organismos multicelulares. Existen también una serie homólogos en el retículo endoplásmico y en los cloroplastos. Las dos isoformas citosólicas HSP90 α y HSP90 β se expresan de manera diferente en organismos multicelulares. En eucariotas superiores se expresa una tercera isoforma, denominada TRAP1 (Figura 12), que carece de la región cargada y parece que interacciona específicamente con sólo unas pocas proteínas sustrato (125).

Para el análisis de la función de las HSP90 se han utilizado inhibidores específicos, identificados entre las sustancias naturales que inhiben la proliferación de células tumorales. Una de estas, la geldamicina (GA) se ha considerado un inhibidor de quinasas, pero sorprendentemente, la única proteína celular a la que se une la GA es la HSP90. El efecto de este fármaco sobre las quinasas es indirecto y se debe a la inhibición de la HSP90, que afecta el plegamiento de la quinasas. La GA se une al dominio N-terminal de la HSP90, en el mismo sitio de enlace del ATP. Por tanto, la GA es un inhibidor competitivo, que forma el complejo GA-HSP9, el cual es de varios órdenes de magnitud mas estable que el formado por el ATP y la HSP90.

La primera indicación de la función celular de las HSP90 en eucariotas superiores fue el sorprendente descubrimiento de que la principal proteína que coprecipitaba con los receptores de las hormonas tiroideas, en ausencia de hormona, era idéntica a la HSP90 (126). Estos complejos eran estables porque sobrevivían a la inmunoprecipitación. Se ha observado que la adición de hormona esteroidea, causa la disociación aparente del complejo y la dimerización del receptor, procesos requeridos para la unión al DNA y la activación transcripcional. La asociación del sustrato con la HSP90, puede considerarse como una etapa intermedia en el proceso de plegamiento. Es razonable especular que la regulación de la conformación del receptor por la HSP90 añade un control adicional a estas cascadas señalizadoras.

HSP33, carabina molecular con interruptor redox

La HSP33, identificada por Chuang y Blatner en 1993 (127), en *Escherichia coli*, como HsIO, es una carabina molecular muy eficiente, cuyo modo de actuación es diferente al de las otras carabinas. Su actividad se regula a nivel post-traducciona por las condiciones redox del medio. La HSP33 en estado reducido es inactiva y tiene átomos de zinc coordinados con sus cisteínas. En condiciones de estrés oxidativo, como la exposición a peróxido de hidrógeno, libera al zinc de las cisteínas, se forman enlaces disulfuro, y de esa forma la HSP33 adquiere forma activa. Los datos del grupo de Jacok (128) sugieren, que en condiciones normales, la HSP33 se encuentra en su mayor parte en forma reducida, pero adquiere forma de carabina molecular activa cuando se somete a un ambiente oxidado. La HSP33 cambia de forma inactiva/activa utilizando los enlaces disulfuro reactivos a modo de interruptor.

La HSP33 se regula a dos niveles: transcripcional y traduccional. El choque térmico induce su expresión, mientras que el estrés oxidativo induce la activación de su función como carabina. Sin embargo, como el estrés térmico y el estrés oxidativo están tan íntimamente ligados en la célula, no sorprende que encontremos incrementos en la expresión de HSP33 en condiciones de estrés oxidativo y un fenotipo sensible a la temperatura en condiciones de choque térmico. A estos efectos superpuestos, del choque térmico y del estrés oxidativo, pueden deberse las consecuencias celulares comunes: lesión proteica, acumulación de proteínas desdobladas e intermediarios proteicos sensibles a la agregación. Estos intermediarios son sustratos potenciales para la HSP33. Una de las posibles razones del estrés oxidativo inducido por el calor, es la desnaturalización de las proteínas antioxidantes que resulta de la acumulación de oxidantes endógenos (129). Esto explica por qué un número de proteínas antioxidantes se inducen por el estrés térmico. Por otra parte, el estrés oxidativo induce la expresión de las proteínas del choque térmico, entre las que se incluye la HSP33 cuya concentración se eleva más de dos veces a los 20 minutos de la exposición a peróxido de hidrógeno. Niveles de expresión similares se detectan en las clásicas HSP después del choque térmico. Esto implica que el estrés oxidativo origina la acumulación de pro-

teínas desdobladas, una señal que desencadena la respuesta al choque térmico.

La HSP33 en su estructura posee cuatro residuos de cisteína cerca del dominio C-terminal. Estas cisteínas se disponen en un motivo C-X-C que se encuentra separado por 30-31 aminoácidos de otro motivo C-X-Y-C.

3.2. 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 α -cristalinas. Todas se unen selectivamente a las proteínas desnaturalizadas o a los dominios de polipéptidos parcialmente plegados (130-132). La mayoría de estas carabinas son, en condiciones normales, constituyentes celulares importantes, 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 evitan interacciones o agregaciones no deseadas (133). Sin embargo, una fracción de esas proteínas nacientes no consigue adquirir su correcta conformación y tiene que ser rápidamente digerida (134). 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 replegamiento de proteínas desnaturalizadas total o parcialmente y llevarlas a sus formas activas (83). 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 (135)

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 (136, 137). 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 (138). 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 sulfoxido reductasa, enzima que repara específicamente este tipo de alteración proteica (139). Es interesante destacar que este enzima se encuentra muy disminuido en cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (140). 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 (141).

3.3. 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 está hoy considerada como un mecanismo estrictamente regulado y necesario para el mantenimiento de la homeostasis celular, mediante la reconstrucción continua de las estructuras celulares, principalmente 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 —las ciclinas los factores de transcripción, y alguno de los componentes de las vías de transducción de señales—, una vez que han terminado de realizar su misión. En tercer lugar, el sistema inmune basa su respuesta en la disponibilidad de péptidos inmunocompetentes que se van a generar en la degradación de antígenos foráneos.

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 células procariotas no poseen compartimentos delimitados por membrana ni sistemas de transporte vesicular y han desarrolla-

do una forma de compartimentación denominada autocompartimentación. Este principio se observa en algunas proteasas no relacionadas que convergen hacia una arquitectura común en la cual las subunidades proteolíticas se autoensamblan y forman complejos en forma de barril, que poseen cavidades interiores de varios nanómetros de diámetro donde se ubica el sitio activo. El acceso a estos compartimentos interiores está restringido a proteínas desdobladas que pueden atravesar el estrecho poro o canal que guarda la entrada. La proteína señalizada para degradarse requiere establecer interacción transitoria o continua, con la maquinaria capaz de unirse a ella y presentarla de forma desplegada a los complejos proteolíticos.

Como, tanto el plegamiento como el desdoblamiento de las proteínas se encuentran íntimamente relacionados desde el punto de vista mecánico, se asume que estas labores están realizadas por complejos ATPasas, que presentan alguna semejanza con las carabinas moleculares, por lo que se las ha denominado carabinas en reverso o desdobladas. El hecho de que su acción requiera la energía procedente de la hidrólisis del ATP, hace que la degradación proteica sea un proceso dependiente de energía, a pesar de que la hidrólisis del enlace peptídico sea en sí un proceso exergónico.

La degradación proteica se encuentra ahora emergiendo como mecanismo de gran interés en procesos de regulación celular tales como el metabolismo y el ciclo celular. Los proteosomas desempeñan un papel importante en el control de estos procesos, mediante proteólisis mediada por señales de enzimas clave y proteínas reguladoras. Los proteosomas operan también en la respuesta al estrés eliminando proteínas alteradas, y en la respuesta inmune regenerando péptidos antigénicos.

Todas 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 enormemente 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 de ser degradadas tienen en primer lugar que ser «marca-

das» por unión covalente a un pequeño cofactor polipeptídico, la ubiquitina.

Se ha mencionado anteriormente que algunas HSP son carabinas moleculares que ayudan a los polipéptidos a adquirir y mantener la conformación funcional. Por el contrario, otras HSP participan en la degradación proteica, cuando la lesión causada por el agente estresante es tan severa que no permite la reparación. Los polipéptidos lesionados irreversiblemente tienen que ser eliminados. Algunas HSP interaccionan con los polipéptidos lesionados y los «presentan» a las proteasas para su digestión. El ejemplo mejor conocido de carabina, que ayuda a la degradación proteica es la ubiquitina, antes mencionada, pequeña proteína de 8 kDa (142, 143). En eucariotas la ubiquitina se une y acompaña a la proteína que se va degradar hacia el proteosoma de 26S, que es donde la proteólisis se verifica. Las proteínas funcionales equivalentes de la ubiquitina en los procariotas son Lon y Cpl, también presentes en mitocondrias de eucariotas (Pim1 homóloga de Lon). Las proteínas Cpl representan diferentes papeles de protección y proteólisis como carabina molecular en *Escherichia coli*.

Carabinas moleculares y degradación proteica en procariotas

En condiciones de estrés la velocidad de degradación proteica se eleva en bacterias (144). El incremento en la actividad proteolítica no se debe a un simple efecto del estrés sobre la estructura de las proteínas sustrato, sino más bien a un requerimiento de carabinas moleculares y proteasas producido por el estrés.

Son dos las proteasas bacterianas inducidas por estrés, la proteasa La y la proteasa Clp, ambas dependientes del ATP. La proteasa La, producto del gen *Lon*, actúa como un tetrámero y la proteasa Clp actúa como un tetradecámero de la subunidad proteasa ClpP, unida a un hexámero de subunidades reguladoras ATPasa, ClpA o ClpX.

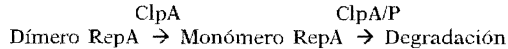
La degradación de la mayoría de proteínas anormales, como péptidos que contienen análogos de aminoácidos, se lleva a cabo por las proteasas La y Clp y requiere DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL y GroES,

todas ellas proteínas del estrés y carabinas moleculares. Las proteínas ClpA, ClpB y ClpX presentan una homología con las HSP de la familia de 100 kDa y además, las ClpB son inducibles por calor. Las ClpA y ClpX pueden actuar solas como carabinas moleculares. Wickner *et al* (145) han demostrado que la ClpA actúa como carabina en la activación *in vitro* de la proteína iniciadora RepA del plásmido P1. La ClpA funciona como las DnaK y DnaJ, monomerizando a RepA y permitiéndole unirse al origen de la replicación del DNA del plás-

TABLA 3. *Carabinas moleculares y proteasas (144)*

<i>Proteína</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Descripción</i>
Carabinas moleculares		
DnaK	bacterias	HSP70
DnaJ		Estimula a DnaK
GrpE		Trabaja con DnaK
GroEL		HSP60
GroES		HSP10, trabaja con GroEL
Factor desencadenante (FD)		Estimula la inserción de proteínas en la membrana plasmática
Ssa1,2	levadura	HSP70 citosólicas
Ssc1		HSP70 mitocondrial
Mdj1		Homólogo de DnaJ mitocondrial
Sis		Homólogo de DnaJ citosólico
Ydj		Homólogo de DnaJ citosólico
HSC73	mamíferos	HSP70 expresada constitutivamente
Proteasas		
La	bacterias	Proteasa dependiente de ATP
ClpP		Subunidad proteolítica de Clp
ClpA		Subunidad ATPasa de Clp; carabina molecular
ClpB		Carabina molecular
ClpX		Subunidad ATPasa de Clp; carabina molecular
Pim1	levadura	Proteasa mitocondrial homólogo de La
Proteosoma	levadura/ mamíferos	Proteasa multisubunidad, dependiente de ATP

mido P1. Además, la ClpA funciona marcando a RepA para su degradación por la ClpP. Este estímulo de la degradación no ocurre cuando RepA se monomeriza por efecto de las DnaK y DnaJ, de forma que la ClpA parece que juega un papel directo marcando a RepA para la degradación por ClpP. El papel de ClpA y ClpX en el marcaje de proteínas para la degradación por ClpP se debe en parte a asociaciones físicas entre la subunidad de la carabina molecular y la subunidad proteasa.



Otras carabinas moleculares se encuentran, al parecer, involucradas en la degradación de proteínas anormales específicas en *Escherichia coli*, pero en estos casos no está claro el papel de las carabinas. La PhoA61, una forma no segregada de fosfatasa alcalina de vida corta, se degrada más rápidamente en respuesta al choque térmico, y la delección del gen *Lon* y del *DnaK*, la estabiliza. Esto prueba que DnaK y la proteasa La están implicadas en la degradación de PhoA61. En ausencia de carabina molecular o proteasa muchas proteínas anormales pueden acumularse y saturar una vía proteolítica responsable de la degradación de PhoA61. Sin embargo, PhoA61 puede también encontrarse asociada con las DnaK, GrpEP y la proteasa La, y en algunas condiciones la velocidad de degradación de phoA61 se relaciona con la cantidad de DnaK asociada con la proteína.

Otras carabinas moleculares parecen estar involucradas en la degradación de otras proteínas anormales específicas en *Escherichia coli*. CRAG es una proteína quimérica que consistente en 12 aminoácidos procedentes del represor cro, una forma truncada de proteína A, y 14 aminoácidos procedentes de la β -galactosidasa (146). CRAG se degrada eficientemente por la proteasa Clp, pero sólo si GroEL y GroES están también presentes. Se ha demostrado también que otra proteína, no reconocida como carabina molecular, el factor desencadenante (FD) se asocia con CRAG y puede intervenir en la degradación de esta proteína anormal.

De los ejemplos mencionados de PhoA61 y CRAG, parece deducirse que DnaK y DnaJ estimulan la proteólisis por la proteasa La,

mientras que GroEl, GroEs y FD la estimulan por la proteasa Clp. Sin embargo, no existen evidencias de interacciones específicas entre estas carabinas moleculares y las proteasas. Otra posibilidad es que las carabinas en cada caso puedan prevenir la agregación masiva de las proteínas sustrato, y por razones desconocidas, PhoA61 pueda ser un buen sustrato para La y CRAG para Clp.

Se desconoce el mecanismo por el cual ClpA, u otra carahina cualquiera, puede replegar algunas proteínas mientras que estimula la degradación de otras. Si la idea de «replegamiento o degradación» antes mencionada se demuestra que es correcta, quizás la estimulación de la degradación se basa simplemente en la duración de la unión de la carabina a la proteína sustrato. Si la proteína se repliega adecuadamente y la carabina se libera, puede que sea insuficiente el tiempo que tendría la proteasa para encontrarse con la proteína sustrato.

Carabinas moleculares y degradación proteica en eucariotas

Existen muchas vías de degradación proteica en levadura y en células de mamíferos. Existen componentes de la vía proteolítica dependiente de ATP y de la ubiquitina, que se inducen por choque térmico (143, 147, 148). Tales componentes incluyen la ubiquitina, dos proteínas transportadoras de la ubiquitina y ciertas subunidades del proteosoma de 26S. Además, en células de mamíferos se induce por choque térmico, una vía lisosómica de proteólisis, la macroautofagia (149). Finalmente una vía selectiva de proteólisis lisosómica requiere la forma constitutiva de HSP70, la HSC73 (150)

Proteólisis mitocondrial

Las mitocondrias pueden ser ocupadas y degradadas por los lisosomas, pero también en este orgánulo, tiene lugar una substancial degradación proteica. Las proteasas intramitocondriales son homólogos a las proteasas La y Clp de procariotas y requieren carabinas mitocondriales para la proteólisis óptima. El homólogo mitocon-

drial de la proteasa La en levadura, la proteasa Pim1, es necesaria para la degradación de las subunidades β de la ATP sintasa y la peptidasa general de la matriz en la mitocondria (151). La HSP70 mitocondrial (mHSP70, producto del gen *ssc1*) y el homólogo mitocondrial de DnaJ, la Mdj1 (Tabla 3), son requeridas para la degradación eficiente de dos proteínas anormales marcadas por Pim1. En ausencia de mHSP70 y Mdj1, las proteínas anormales forman grandes agregados.

Vía proteolítica ubiquitina-proteosoma

Las carabinas moleculares son necesarias para la degradación de ciertas proteínas anormales por la vía de la ubiquitina-proteosoma, en levadura y en células de mamíferos. Las mutaciones en los genes de la HSP70 (*ssa1* y *ssa2*) y los mutantes sensibles a la temperatura de los homólogos DnaJ, Ydj y Sis (Tabla 3) reducen la degradación de las proteínas que contienen análogos de aminoácidos y de las proteínas de vida más corta. La degradación de la mayoría de proteínas de vida larga no se afecta por tales mutaciones. La proteína Ydj parece facilitar la ubiquitinación de proteínas, mientras que Sis parece promover la rotura de las proteínas ubiquitinadas por el proteosoma.

La degradación, dependiente de ubiquitina, de una ciclina de levadura, producto del gen *cln3*, se estimula por el homólogo de la DnaJ, la Ydj. En este caso, la ciclina tiene que sufrir la fosforilación, estimulada por la Ydj, antes de ser ubiquitinada. Ydj actúa modificando la estructura de la ciclina sustrato, haciéndola más susceptible para la fosforilación, ya que Ydj se une a la ciclina cerca de su sitio de fosforilación. La mayoría de los homólogos de la DnaJ, trabajan en conjunción con la HSP70 (152).

Otros estudios indican que la HSC73 promueve la conjugación de la ubiquitina con ciertas proteínas desnaturalizadas en extractos de reticulocitos. Se llegó a esta conclusión por inmunodepleción de la HSC73 y demostrando la disminución de la tasa de ubiquitinación de ciertas proteínas sustrato. También, la HSP73 se requiere para la degradación eficiente de ciertas proteínas ubiquitinadas (144).

Proteolisis lisosómica

Los trabajos del grupo de Hayes (144) se han dedicado al estudio de la participación de la HSC73 en el transporte selectivo de ciertas proteínas citosólicas hacia el lisosoma, donde han de ser degradadas. El papel de la HSC73 en esta vía degradativa, parece que promueve la importación de proteínas o su transporte hacia otros orgánulos (150). Se han identificado intermediarios cinéticos y tales intermediarios son característicos del proceso de importación de proteínas a través de canales polipeptídicos. Para el transporte de proteínas hacia otros orgánulos, es probable que exista un complejo de receptores y un transportador polipeptídico en la membrana lisosómica que reconoce la proteína sustrato.

De todo lo anteriormente expuesto se deduce que, tanto en procariontas como en eucariotas, las carabinas moleculares se requieren para la degradación lisosómica de proteínas anormales y de ciertas proteínas normales de vida corta. En algunos casos el papel de las carabinas es simplemente prevenir la formación de grandes agregados de proteínas, lo cual es una de las funciones primarias en el plegamiento y traslocación proteicas. Sin embargo, las evidencias sugieren que las carabinas moleculares pueden jugar un papel más específico en la ruptura de proteínas, bien por estar asociadas con las proteasas (como la Clp), facilitando las etapas limitantes en la degradación (como la fosforilación de Cln3), o facilitando el transporte selectivo de las proteínas a los lisosomas

Proteosoma: maquinaria de destrucción

El proteosoma es un complejo multimérico con actividad proteasa con un coeficiente de sedimentación aparente de 20S. Este complejo multimérico puede unirse a otros dos tipos de complejos reguladores el PA700 y el PA28, los cuales se unen a ambos lados del proteosoma de 20S cilíndrico. La unión del proteosoma de 20S con dos complejos PA700 da lugar al proteosoma de 26S que consiste en una proteasa eucariota, dependiente del ATP, que aparece organizada como un gran complejo de 2000 kDa, formado por unos 40 polipéptidos, cuya misión es facilitar la proteólisis rápida. Se asume

que es una máquina de destrucción con capacidad para actuar sobre las proteínas celulares que posean señales específicas de degradación.

El proteosoma de 20S tiene un peso molecular de 700 a 750 kDa y está compuesto por subunidades de 21 a 30 kDa que poseen puntos isoeléctricos muy distintos, de 3 a 9 y están dispuestos formando cuatro anillos apilados de tal manera que forman una estructura cilíndrica. Las subunidades pueden dividirse en dos subfamilias α y β . Siete homólogos α y polipéptidos β se reúnen en cada anillo α y β , respectivamente. Estos anillos se asocian en forma $\alpha\beta\beta\alpha$ para formar la partícula cilíndrica. El centro del anillo α está cerrado para impedir la penetración de las proteínas en la superficie interna del anillo β que es donde reside el centro catalítico que posee tres residuos de subunidades β . La función de los complejos reguladores PA700 o PA28 insertos al anillo α , debe ser la de abrir la puerta del anillo β para la entrada de la proteína sustrato.

El módulo terminal en forma de uve, PA700, juega un papel regulador y consiste en una serie de subunidades heterogéneas de 25 a 110 kDa clasificadas en dos subgrupos:

- a) Un subgrupo que posee al menos 6 ATPasas que constituyen una única familia multigénica que codifica polipéptidos homólogos conservados durante la evolución, y
- b) un segundo subgrupo de unas 15 subunidades, no ATPasas, la mayoría de las cuales no se encuentran relacionadas entre sí.

El papel de las ATPasas es el de suministrar energía para la degradación selectiva de las proteínas por el proteosoma 26S. Es probable que dicha energía sea necesaria para el desdoblamiento de las proteínas, las cuales, una vez desdobladas podrán penetrar en el canal de anillos α y β del proteosoma 20S. Sin embargo, no se sabe por qué tal cantidad de ATPasas con elevadas homología se asocian al PA700, aunque se piensa que pueden tener distintas funciones. Las 6 ATPasas son miembros de una gran familia de proteínas (ATPasas asociadas con una variedad de actividades celulares) caracterizadas por un dominio conservado de 200 aminoácidos que contiene una secuencia consenso para un módulo de enlace al ATP.

Algunas de las ATPasas proteosómicas poseen motivos relacionados con la cremallera de leucina o la helicasa y se descubrieron como factores transcripcionales independientes de los proteosomas, sugiriéndose que deben tener una función dual, desconociéndose aún sus funciones bioquímicas exactas.

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 repliegamiento 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 (144).

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 señala-

das 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 (153) como una proteína de 76 aminoácidos y 8,6 kDa, muy abundante y ampliamente distribuida, de ahí su nombre. Posteriormente el grupo de Hershko (154-155), la identificó como un componente esencial del sistema proteolítico dependiente de ATP en un extracto de eritrocitos de ratón y descifró la enzimología de la ubiquitinación. Varshasky y colaboradores, (156, 157) tuvieron la primera evidencia del requerimiento de la ubiquitina para la degradación proteica, la cual era esencial para la progresión del ciclo celular, presagiando el papel que jugaban las ciclinas, cuya destrucción periódica dependiente de la ubiquitina, era la fuerza conductora del ciclo. En 1986, este mismo grupo descubrió la primera señal degradativa del sistema ubiquitina.

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 intermedio catalizado por la proteína-ubiquitina ligasa (E3) (Figura 13).

Múltiples residuos de ubiquitina se insertan repetidamente en las proteínas formando una cadena ramificada de ubiquitininas. Este sistema de modificación post-traducciona fue descubierto por Hershko en 1992 (158). 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).

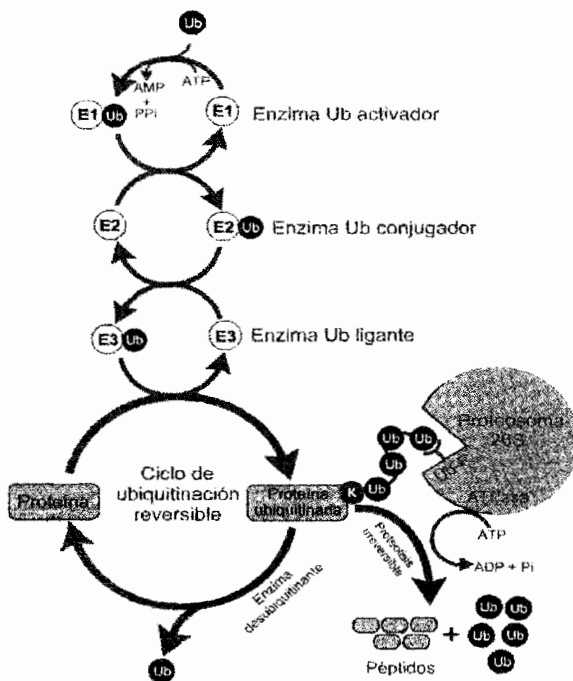


Figura 13. Vía de la ubiquitina proteosoma para la degradación de proteínas. Explicación en el texto.

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 antienzima (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*). Tiene otras propiedades como la de activar al NF- κ B mediante la conversión del precursor p105 en la proteína madura p50. El precursor p105 se multiubiquitina antes de la proteólisis lo que indica que la ubiquitina está también implicada en este proceso.

Cabe preguntarse por qué el proteosoma destruye sólo el dominio terminal -COOH del precursor del NF- κ B que contiene los residuos repetidos ankirina. Una posibilidad es que el motivo rico en glicocola, en la porción media de la proteína precursora, confiera resistencia a la desnaturalización del dominio N-terminal permitiendo así al proteosoma la degradación de la región -COOH terminal.

4. INTERACCIONES DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS

Las interacciones de la respuesta al estrés se encuentran implicadas en la disfunción de células y órganos. La célula para mantenerse viva después de una agresión (estrés) requiere orquestrar con precisión una serie de mecanismos de señalización que actúen alertando a procesos biosintéticos para que se desencadene una cascada de reacciones cuyos productos sirvan de estímulo para activar la expresión génica de las proteínas del estrés. La inhibición de la expresión de las proteínas del estrés eleva la susceptibilidad celular a cualquier situación adversa. Los efectos negativos del estrés sobre el crecimiento y diferenciación celulares incluyen efectos teratogénicos en la embriogénesis de mamíferos, parada y sincronía del ciclo celular y efectos inhibidores sobre la síntesis del DNA, RNA y proteínas.

Cualquier forma de agresión celular subletal induce una respuesta adaptativa. Las interacciones de estas respuestas no se pueden predecir, pues las permutaciones en la secuencia de acontecimientos que se desencadenan después de la lesión, pueden promover efectos opuestos sobre el resultado final. Las interacciones entre las respuestas contribuyen al destino final de las células, tejidos y órganos y la modulación de estas interacciones pueden tener efectos importantes sobre la función y la supervivencia. Por ejemplo, una situación de estrés térmico protege a las células de una respuesta inflamatoria posterior, mientras que ese mismo choque térmico aplicado a células seleccionadas por inflamación, precipita a la apoptosis. A estos fenómenos que inducen citoprotección o citotoxicidad Demmeler y colaboradores (159) lo denominan *la paradoja del choque térmico*. Se conocen muy poco, hasta la fecha, los mecanismos

moleculares mediante los cuales las células integran las respuestas a estas y a otras clases de situaciones de estrés.

Cualquier clase de patología humana conduce a diversas situaciones de estrés que se desarrollan después de la agresión inicial. Entre estas patologías se incluyen las siguientes: shock, fiebre, cirugía, infección y malnutrición. Aunque cada una de ellas puede, independientemente, culminar en la disfunción del órgano y la muerte, la descripción del paradigma de «dos estímulos» propuesta por Moore y Moore (160), sugiere que la disfunción de células y órganos ocurre con más probabilidad después de una secuencia de situaciones de estrés, no aditivas, pero que interaccionan para causar la disfunción. La hipótesis de Deemster y colaboradores (159) es que las interacciones de la respuesta al estrés contribuyen al destino celular. La modulación de estas interacciones puede causar alteraciones, tanto en la función del órgano como en la supervivencia del organismo. Las interacciones entre respuestas celulares a situaciones de estrés prototipo, tales como choque térmico e inflamación son paradójicas y determinan la supervivencia o la muerte

El modelo tradicional de una sola agresión para el estudio de la lesión, reproduce de manera incompleta el complejo curso clínico en los organismos lesionados. La hipótesis más relevante de dos agresiones, antes mencionada (160), se basa en la observación que el resultado de dos estímulos secuenciales es diferente del resultado de cada estímulo por separado. En la Figura 14 se muestran los dos estímulos sobre el resultado final de recuperación o disfunción total.

Se ha insistido repetidas veces, que la respuesta celular al choque térmico ejerce efectos citoprotectores muy potentes frente a posteriores agresiones térmicas o de otro tipo, que precipitarían a la muerte de la célula. Sin embargo, se ha demostrado que la inducción de la respuesta al choque térmico en células en las que previamente se ha producido inflamación con lipopolisacárido, acelera la muerte celular. De estos hechos comprobados puede resumirse, que la inflamación seguida de choque térmico ocasiona la muerte por apoptosis, mientras que el choque térmico previo a la inflamación induce la citoprotección. En conclusión, la respuesta fenotípica de

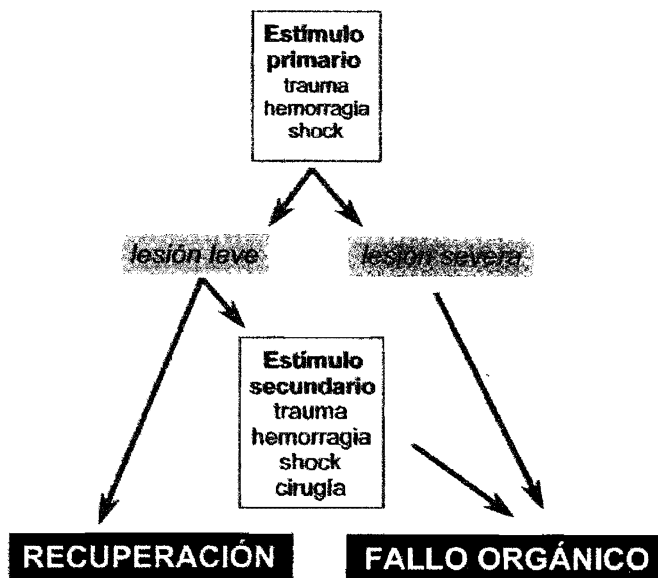


Figura 14. El paradigma de dos golpes. Dos estímulos tolerables pueden interactuar y producir recuperación o disfunción total (159)

las células al choque térmico está ligada al estado de la célula, siempre que la célula se encuentre en un estado basal.

CHOQUE TÉRMICO (HSP) (elevación de la temperatura) → INFLAMACIÓN = CITOPROTECCIÓN (Lipopolisacárido)

INFLAMACIÓN (LPS) → CHOQUE TÉRMICO (HSP) = MUERTE (elevación de la temperatura)

¿Cuál es el mecanismo molecular de estas interacciones?. Experimentos recientes han comenzado a explorar lo que ocurre si se seleccionan células endoteliales después de un tratamiento con lipopolisacárido (LPS). La activación de estas células depende de un factor de transcripción prototipo de fase aguda, el NF- κ B. La inhibición del NF- κ B con pirrolidina tiocarbamato no solo inhibe la unión de este factor al DNA, sino que los efectos de esta inhibición son similares a los del choque térmico, ya que la pirrolidina tiocarbamato induce la expresión de la HSP72 y la traslocación nuclear del HSF1. Estas observaciones han llevado a proponer «*la paradoja del NF- κ B*» similar a «*la paradoja del choque térmico*». Posteriores investigaciones han demostrado la hipótesis recíproca: que la inducción de la respuesta al estrés origina la inhibición de la actividad de unión del NF- κ B al DNA y está asociada con la acumulación del inhibidor I- κ B α (159).

Inhibición NF κ B (HSP)	→ INFLAMACIÓN = CITOPROTECCIÓN (LPS)
INFLAMACIÓN (LPS)	→ Inhibición NF κ B = MUERTE (HSP)

Después de estos experimentos, estos autores han propuesto la existencia de un mecanismo que enlaza la inducción de la respuesta al choque térmico con la inhibición de la actividad de enlace del NF- κ B al DNA vía inducción de la expresión del inhibidor I- κ B α . El I- κ B α , una proteína HSP putativa, debe ser el punto de interacción entre la respuesta al choque térmico y la respuesta a la inflamación y de esta manera, la paradoja del choque térmico puede ser una manifestación de la paradoja del NF- κ B.

El destino celular parece que se encuentra determinado por el NF- κ B. Es difícil compaginar cómo el mismo estímulo, la disminución de la capacidad de enlace del NF- κ B al DNA, puede ser a la vez citotóxico y citoprotector. Es un hecho demostrado que la inhibición de la actividad NF- κ B puede inducir la apoptosis en células pretratadas con un estímulo inflamatorio (LPS, TNF α o radiaciones ionizantes). Esto lleva a proponer que este factor de transcripción juega un papel como factor de supervivencia, responsable de activar los genes que bloquean la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, se ha

descrito que la inhibición de la actividad de unión del NF- κ B al DNA puede también ser citoprotectora (159). El mecanismo a través del cual se verifica esta citoprotección no está claro, pero puede ser que los inhibidores de la actividad transcripcional del NF- κ B (arsenito, NO, etc) actúen induciendo la expresión de las HSP (Figura 15).

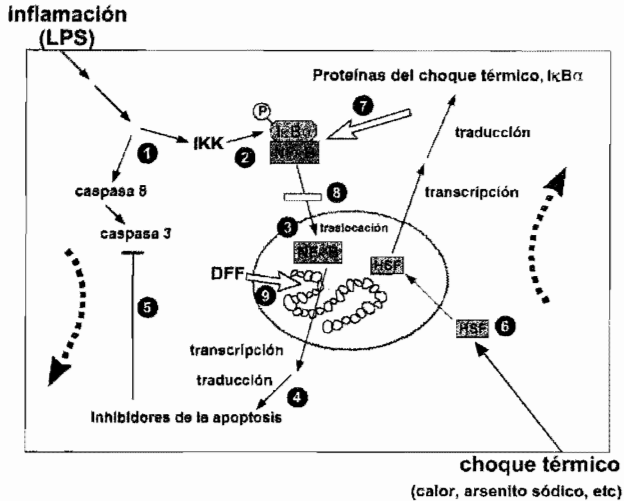


Figura 15. La interacción de las respuestas al choque térmico y a la inflamación se encuentran a nivel de transcripción génica. (1) Los mediadores inflamatorios (LPS) inducen simultáneamente vías proapoptóticas (caspasa 8) y antiapoptóticas (IκB quinasa IKK) (2) La fosforilación del IκB libera el NFκB citosólico que se trasloca al núcleo (3), se une a los promotores de los genes inflamatorios e incrementa la transcripción y la traducción de una serie de genes inflamatorios y antiapoptóticos (4). Los genes antiapoptóticos inhiben las vías apoptogénicas (5). La inducción de la respuesta al choque térmico conduce a la traslación al núcleo del HSF1 con la resultante transcripción y traducción de las HSP, incluyendo el IκBα (6). El incremento en IκBα disminuye la traslación del NFκB (7). La menor traslación al núcleo del NFκB disminuye la traducción de proteínas antiapoptóticas (8). El equilibrio entre vías pro y antiapoptóticas favorece las vías proapoptóticas y la fragmentación del DNA (159).

En las células existe una superposición entre las respuestas a diferentes situaciones de estrés (oxidativo, calor, inflamación, radiación, etc). La activación de la respuesta al estrés por fiebre, isquemia, reperfusión o restricción calórica, puede contribuir a la apoptosis en células activas. Por otro lado, la inducción de la respuesta al estrés en momentos previos a la agresión puede ofrecer protección sustancial frente a una posterior agresión.

Los papeles de las dos paradojas antes citadas, no han sido caracterizados en órganos intactos ni se ha demostrado su importancia en el organismo completo. Es imperativa una apreciación de la relevancia clínica de estas dos paradojas, ya que muchos laboratorios están ya ensayando, a nivel preclínico, la citoprotección mediante inducción del choque térmico o la inhibición de la unión del NF- κ B al DNA. La activación de estas dos respuestas en células o animales expuestos previamente a endotoxina, puede elevar inesperadamente la muerte celular y empeorar los resultados. Está demostrado que el fallo de un órgano y la muerte de pacientes va acompañada por un incremento en la muerte celular por apoptosis inducida por estrés (159).

4.1. Apoptosis

Las HSP pueden influenciar la apoptosis mediante interacciones físicas directas con componentes clave de la maquinaria apoptogénica. Las vías moleculares que conducen a la apoptosis se encuentran estrictamente reguladas por una serie de señales positivas y negativas, cuyo equilibrio determina si una célula ha de vivir o morir. La activación de la unión HSF1-DNA y la expresión de la HSP70 inducible, capacitan a las células para resistir a diversas formas de estrés y sobrevivir.

En las células de mamíferos la apoptosis está mediada por vías señalizadoras extrínsecas, dependientes de receptor, o intrínsecas, dependientes de la mitocondria. Estas dos vías convergen en la activación de una familia de enzimas proteolíticas, las caspasas. El proceso de activación depende de la capacidad de determinadas caspasas precursoras, de oligomerizarse y autoactivarse después del

reclutamiento de complejos específicos receptores de muerte, que se unen a la membrana plasmática (en el caso de la caspasa-8), o que se agregan en el citoplasma (en el caso de la caspasa-9) (161). En el último caso la caspasa-9 se une a un complejo apoptosómico, Apaf-1, compuesto de varias moléculas. La oligomerización de Apaf-1 depende en sí misma de una interacción inicial con el citocromo c y el ATP (162). Este proceso dinámico de interacciones físicas y alteraciones conformacionales entre los componentes proteicos de la maquinaria apoptogénica, es de importancia crucial para los mecanismos en los que se sustenta la activación. En este proceso juegan un importante papel las carabinas moleculares, las cuales pueden influir sobre la unión, transporte y plegamiento de otras proteínas que afecten directamente la ejecución o la inhibición de las vías señalizadoras apoptogénicas (163). Estas ideas tienen su base en estudios que muestran una influencia positiva de la proteína HSP60 sobre la maduración proteolítica de los precursores de las caspasas ejecutoras (164, 165, 166), y la influencia negativa de la HSP27 y la HSP70 sobre la señalización apoptogénica (167, 168). Estos estudios han demostrado que la HSP27 se une al citocromo c liberado de la mitocondria y previene así su interacción con Apaf-1. En una serie complementaria de experimentos, el grupo de Beere (169, 170) y el de Saleh (171), han comprobado que la HSP70 inhibe la apoptosis por unión directa con Apaf-1, previniendo la maduración de la caspasa por el apoptosoma. Li y colaboradores (172), apoyan estos hallazgos respecto a la HSP70 y demuestran que esta proteína ejerce sus efectos inhibidores después de la liberación del citocromo c y antes de la activación de la caspasa 3. Otros investigadores han propuesto un efecto negativo sobre la función del Apaf-1 como consecuencia de una unión directa a la HSP90 (173). Aunque existen discrepancias entre los diferentes grupos de investigadores respecto al mecanismo de inhibición y la naturaleza física de la interacción de las HSP sobre la maquinaria apoptogénica, el tema que surge con más intensidad es que las HSP actúan a nivel del apoptosoma y así previenen los procesos proteolíticos y la maduración de las caspasas.

Parece que el efecto anti-apoptogénico ejercido por la HSP70 al unirse al Apaf-1 está bastante claro, sin embargo, no lo está tanto el mecanismo y la naturaleza física de tal inhibición. Se ha propuesto que la interacción HSP70-Apaf-1 se realiza a través de un dominio

de reclutamiento de la caspasa (CARD) y provoca la inhibición de la oligomerización de Apaf-1 (171). La necesidad de ATP para la interacción HSP70-Apaf-1 indica que la actividad foldasa de la HSP70 es crítica en esta interacción. Un requerimiento similar ha sido recientemente demostrado para estimular el procesamiento de la caspasa 3 mediado por la HSP60 (165).

Existen otras pruebas que demuestran el efecto protector de las HSP frente a la apoptosis. Por ejemplo, la estabilización de la RIP quinasa, una proteína antiapoptótica que interacciona con los factores de muerte, depende de la HSP90. La degradación de dicha quinasa en ausencia de HSP90 evita la activación, mediada por el TNF α , del NF- κ B, y conduce las células hacia la apoptosis (167).

Recientemente se ha detectado que el factor de muerte FAS, una proteína de membrana que actúa como un importante factor apoptogénico, en su forma activa, inhibe la inducción por calor del HSF1 y la expresión de la HSP70 (174). La inhibición de la unión HSF1-DNA se basa en la ausencia de hiperfosforilación del HSF1 durante la actividad del FAS. Estos efectos de FAS sobre la respuesta al estrés HSF1/HSP70 se bloquean por los inhibidores de las caspasas.

La función antiapoptogénica de las HSP27 y HSP70, implica varias interacciones con otros componentes de la maquinaria apoptogénica. Por ejemplo, la HSP70 y su homólogo constitutivo, la HSC70, interaccionan con Bag1 (175), perteneciente a una familia de proteínas descrita inicialmente como antiapoptótica, que comparte una región de interacción, denominada «dominio BAG», capaz de unirse y regular la actividad y la expresión de las carabinas moleculares HSP70/HSC70. Song, Takeda y Morimoto (176) han descrito recientemente que Bag1 regula funcionalmente la actividad de proteínas transductoras de señales y la de factores de transcripción implicados en las respuestas celulares al estrés, apoptosis, proliferación, migración celular y acción hormonal. Estos mismos autores han observado que la HSP70, coordina señales para el crecimiento celular en respuesta a agresiones celulares, mediante la inhibición de la actividad de la Raf1 quinasa. Raf1 y HSP70 compiten por unirse a Bag1, ya que Bag1 se une y activa a Raf1, que posteriormente activa a las quinasas relacionadas con las señales extracelulares (ERK), las cuales fosfori-

lan todavía más kinasas y factores de transcripción implicados en el crecimiento celular y en la diferenciación. Cuando los niveles intracelulares de la HSP70 son elevados, esta proteína desplaza a Raf1 del complejo Bag1-Raf1; entonces se forma el complejo Bag1-HSP70 y la síntesis del DNA se frena. Los mutantes que impiden la unión de HSP70 a Bag1, activan constitutivamente las quinasas Raf1/ERK y de esta manera, la síntesis del DNA no resulta afectada negativamente por el estrés. El análisis estructural y las interacciones de Bag1 con HSC70 han sido recientemente estudiadas (177), con el intento de identificar los residuos que interaccionan en el complejo Bag1-HSC70. Mediante el uso de métodos multidimensionales de resonancia magnética nuclear, se ha demostrado en Bag1 un fragmento de unión a la HSC70, que consiste en un haz de tres hélices antiparalelas. Los residuos que interaccionan con la HSC70 descansan en vueltas adyacentes de $\alpha 2$ y $\alpha 3$ y se localizan en la misma cara del dominio conservado de Bag. Las predicciones estructurales se confirmaron por mutagénesis dirigida a estos residuos y dieron como resultado la pérdida de capacidad de unión de Bag1 a HSC70. El acoplamiento molecular de Bag1 a HSC70 y la mutagénesis de HSC70 marcó la superficie molecular del dominio ATPasa necesario para la interacción con Bag1. Estos resultados proporcionan bases estructurales para conocer el mecanismo por el cual las proteínas Bag se unen a las carabinas moleculares y a las vías señalizadoras celulares.

Los trabajos del grupo de Flora de Pablo (178), que estudiaban la función antiapoptogénica de la (pro)insulina durante el desarrollo embrionario, han detectado que la HSC70 (heat shock cognate 70) se encontraba implicada en esta supervivencia. Al profundizar en este tema observaron que el mRNA y los niveles de proteínas de la carabina molecular expresada constitutivamente HSC70, se encontraban regulados por la (pro)insulina en las etapas tempranas del desarrollo de embriones de pollo. Estos autores han demostrado, utilizando oligonucleótidos antisentido frente al mRNA de la (pro)insulina, que la expresión de la HSC70, es dependiente de la (pro)insulina y también que la apoptosis afecta a las células con niveles más bajos de HSC70. Estos resultados demuestran que la carabina molecular HSC70 se encuentra también involucrada en el control de la supervivencia celular en las fases tempranas del desarrollo.

La HSP70 parece que ejerce también un efecto protector antiapoptótico dirigido hacia una o más de las etapas situadas más allá de la caspasa-3 (179). Se ha observado que la mayor expresión de HSP70 no evita la activación de la caspasa-3, pero previene los cambios morfológicos característicos de las células que mueren. Con respecto a la HSP27, se ha observado que se une directamente e inhibe el procesamiento de la caspasa-3. Todos estos estudios revelan que existe una conexión importante entre las HSP y la maquinaria apoptogénica, dado que la homeostasis celular representa un equilibrio entre supervivencia y muerte (Figura 16).

4.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo tiene lugar como consecuencia de una generación elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS). Pueden detectarse elevaciones de ROS en células expuestas a diversos estímulos, como luz UV, concentraciones de peróxido de hidrógeno, presencia de citoquinas inflamatorias (TNF α , IL1), etc. Las ROS, además de su papel citotóxico cuando su producción es excesiva, a concentraciones moderadas actúan como segundos mensajeros en diferentes mecanismos de transducción de señales (180).

Las células que producen elevadas cantidades de ROS se exponen a su propia toxicidad y deben contar con mecanismos defensivos para hacer frente a la agresión oxidativa. Se ha propuesto que las HSP sirven para tal función y representan una clase original de proteínas con capacidad antioxidante. La posibilidad de que las HSP formen parte de los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo, viene avalada por una serie de observaciones que ha llevado a proponer que las ROS actúan como moduladores o segundos mensajeros en la respuesta al estrés y que las células o los tejidos sometidos a estrés oxidativo inducen la síntesis *in vivo* e *in vitro* de las HSP. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno es capaz de inducir una respuesta al estrés en células humanas *in vitro*, mientras que el daño por isquemia/reperfusión induce la síntesis de las HSP *in vivo*. La isquemia se asocia con una disminución de los niveles de ATP por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, que da lugar a la acumulación de xantina e hipoxantina. Estos sustratos se metaboli-

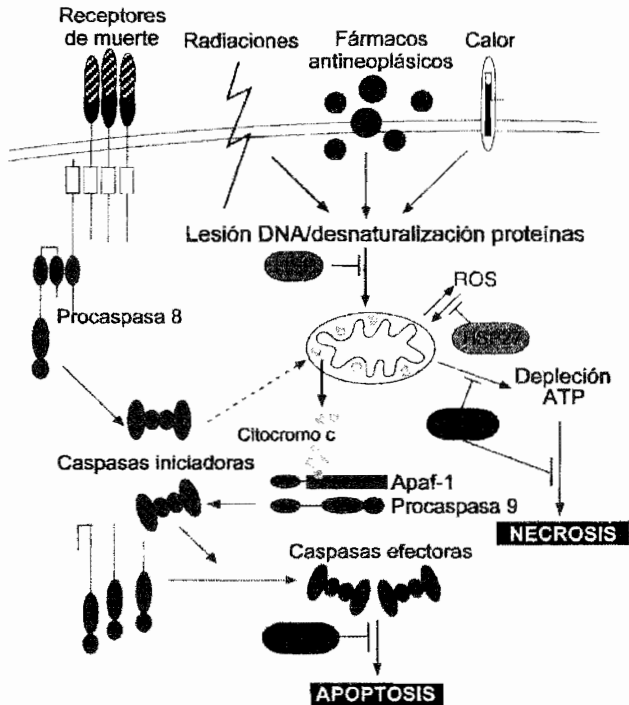


Figura 16. HSP y apoptosis. Vías utilizadas por las HSP para bloquear la muerte celular por apoptosis o necrosis, inducida por receptores de muerte FAS, radiación, fármacos antitumorales y calor. Las HSP inhiben la lesión producida por las proteínas desnaturalizadas impidiendo la agregación proteica y promoviendo la renaturalización. Las HSP inhiben la formación de ROS y funcionan en las etapas finales de la apoptosis inhibiendo la actividad de los efectores apoptogénicos. Alternativamente, las HSP incrementan la resistencia de las células a la privación de ATP (237).

zan normalmente por acción de la xantina deshidrogenasa, pero durante la isquemia y en presencia de calcio, este enzima se modifica y actúa como xantina oxidasa. En casos de isquemia/reperfusion, la xantina se degrada vía xantina oxidasa, dando lugar a grandes cantidades de anión superóxido. El exceso de estos radicales de oxígeno es la causa de la inducción de las HSP en el órgano que ha sufrido isquemia/reperfusion. Se ha observado en roedores y conejos que cuando fueron sometidos a una hipertermia causante de la elevación de HSP en corazón, sufrieron menor daño miocárdico frente a un episodio de posterior isquemia/reperfusion (181).

Todos los organismos acrobios poseen mecanismos de defensa antioxidante para prevenir el daño oxidativo. Bacterias como *Salmonella typhimurium*, se adaptan a los efectos letales de los oxidantes por la inducción de los genes del estrés, que se encuentran bajo el control de una proteína, la OxyR, que se une al DNA en presencia de H_2O_2 y de otra, la SoxR, que lo hace en presencia del anión superóxido. Es interesante destacar que tres de las nueve proteínas dependientes de OxyR son también inducibles por el calor y se ha descrito un mutante de *Salmonella typhimurium*, OxyR1, resistente a una gran variedad de agentes oxidantes que expresa constitutivamente las HSP (180, 181).

Ya se comentó anteriormente que Jacob y colaboradores (128) han descubierto, en *Escherichia coli*, un miembro de una nueva familia de proteínas del estrés, la HSP33, una potente carabina que se distingue por su modo de regulación funcional, dependiente del estado redox de la célula. La HSP33 se localiza en el citoplasma y posee en su molécula muchos residuos de cisteína, que responden rápidamente a cambios redox. Se ha observado que en condiciones de estrés oxidativo, como puede ser en presencia del H_2O_2 , se originan puentes disulfuro entre las cisteínas de la molécula de HSP33, lo cual activa su función. Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la función de HSP33 es la de proteger las células del exceso de oxidantes. Por tanto, estos autores proponen que la HSP33 pertenece a una nueva familia de HSP de bajo peso molecular, que protege a las células del estrés oxidativo.

Son muchos los argumentos en favor del papel protector de las HSP frente al daño oxidativo. Entre ellos cabe destacar:

- a) Protección parcial por pretratamiento térmico de la muerte celular inducida por H_2O_2 en una línea premonocítica humana U937 y de la inducida por oligomicina en células DS7;
- b) Protección por pretratamiento térmico de la estimulación por glutamato, en un modelo usado *in vitro* para conseguir un daño isquémico (oxidativo) en células neuronales;
- c) Protección por hipertermia del daño inducido por la exposición a la luz (mediado por oxidación) en retina de rata; e
- d) Identificación de una proteína de 32 kDa, la hemooxigenasa, específica de la oxidación del grupo hemo, como un enzima con propiedades antioxidantes.

El choque térmico previene las alteraciones en el potencial de membrana, en la masa y en la ultraestructura inducidas en la mitocondria por el H_2O_2 . Esto parece indicar que este orgánulo representa una diana selectiva para la protección, por choque térmico, del daño oxidativo. También se ha demostrado que tras un tratamiento térmico, la HSP70 se traslada al núcleo y se acumula transitoriamente en el nucleolo. Por el contrario, cuando lo que se adiciona es H_2O_2 , la traslocación nuclear es diferente y puede relacionarse con el daño al DNA por radicales de oxígeno. El papel que las HSP puedan jugar como atrapadores (*scavengers*) de las especies reactivas de oxígeno, podría ser de particular importancia en aquellas condiciones en las que los clásicos sistemas antioxidantes, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, vitamina E, etc., sean insuficientes. Por ejemplo, la disminución del glutatión intracelular potencia la inducción de las HSP. La iodoacetamida es un típico agente alquilante citotóxico, que reacciona con los grupos tiólicos de las proteínas para formar aductos S-acetamido tioeter. Aunque la formación de aductos se asocia con la síntesis de las HSP y la muerte celular, la unión covalente de la iodoacetamida no causa la muerte celular directamente, sino que ésta va unida a una disminución del glutatión intracelular y a la peroxidación lipídica. Usando la iodoacetamida se ha observado, que la perturbación en el estado redox tiólico, puede ser una señal importante para la activación de la respuesta al estrés común a aquellos tóxicos que forman intermediarios reactivos. La pérdida del glutatión (GSH) favorece la oxidación de los grupos SH de las proteínas por formación de puentes disulfuro, proteína-S-S-proteína o proteína S-SG (Figura 17). Esta mezcla de

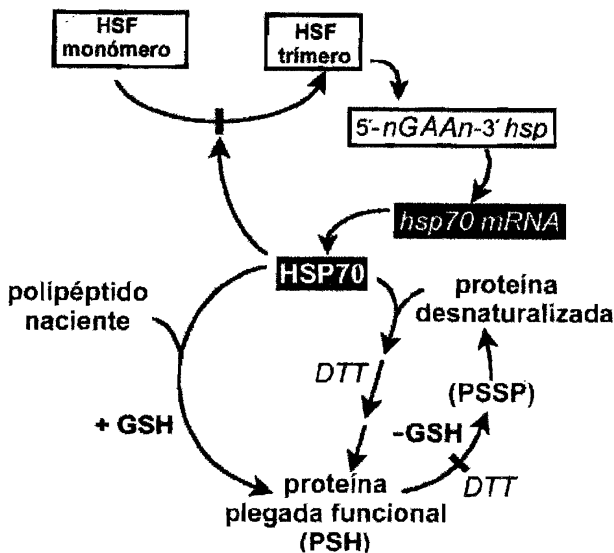


Figura 17. Estado redox tiol-disulfuro como señal para activar el HSF1 por agentes alquilantes. Se muestran los estados monoméricos y triméricos del HSF1. PSSP y PSH indican proteínas disulfuro y proteínas tiol, respectivamente. 5'-nGGA-3'hsp representa el elemento DNA de un HSE. La barra que cruza una flecha indica un punto de inhibición. DTT = ditiotreitól, agente reductor [40].

proteínas oxidadas se encuentra involucrada en la activación del HSF1 y en el aumento de la transcripción de los genes *hs*. Por otro lado, la protección que las HSP ejercen sobre la citotoxicidad inducida por el $TNF\alpha$, está también en relación con su capacidad de mantener la concentración intracelular del glutatión. Sería interesante determinar si es éste un mecanismo general de activación del HSF1 que pudiera aplicarse a los agentes tóxicos reactivos.

Otra situación que puede reforzar esta hipótesis es la que representa la inducción selectiva de las HSP por interleuquina-1 (IL-1) en los islotes de Langerhans. Comparadas con otras células, las células de los islotes pancreáticos contienen pequeñas cantidades de los sistemas enzimáticos antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Por tanto, la citotoxicidad selectiva de la IL-1 hacia estas células podría relacionarse con la insuficiente capacidad de estas células para producir los clásicos antioxidantes representando la síntesis de las HSP una respuesta antioxidante alternativa.

Por tanto, los mecanismos de protección de las HSP podrían incluir:

- a) Prevención de la degradación de proteínas y de la peroxidación lipídica de las membranas;
- b) Mantenimiento de los niveles de ATP;
- c) Inducción de los enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa o de moléculas como el glutatión; e
- d) Inhibición de cualquiera de los múltiples pasos involucrados en la muerte celular inducida por un daño oxidativo como puede ser el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, activación de la fosfolipasa A_2 y el mantenimiento de la ultraestructura celular.

A pesar de que las ROS se consideran segundos mensajeros ubi-cuos, en la inducción de las HSP, se ha investigado la implicación de estas especies endógenas sobre la síntesis de las HSP. La fagocitosis a través de la activación de la NADPH oxidasa, que genera cantidades masivas de O_2^- y H_2O_2 , ha servido de modelo para estudiar la inducción de las HSP en monocitos de sangre periférica. Los resultados obtenidos sugieren que no es la producción de O_2^- y H_2O_2 la responsable directa de la inducción de las HSP durante la fagocitosis, sino el radical hidroxilo ($\cdot OH$), resultante de la transformación del radical superóxido en presencia de hierro. Sólo el radical hidroxilo tiene capacidad de oxidar las proteínas de forma similar a la agresión térmica, siendo la presencia de proteínas alteradas la señal última para la inducción de las HSP. Existe una diferente inducción de la expresión de las HSP según que el estímulo sea la elevación de la temperatura o la activación de la proteína quinasa C (PKC) por el éster de

forbol PMA. En el primer caso se inducen todas las HSP clásicas (HSP 110, HSP 90, HSP 70, HSC 70, HSP 65 etc.), y en el segundo se induce la HSP 90 y en menor grado la mezcla de las HSC 70 y HSP 70. Esto es consecuencia de la implicación de dos segundos mensajeros distintos, calor y PMA, y de mecanismos diferentes de regulación molecular en la expresión de las HSP. La agresión térmica regula la inducción de las HSP a nivel transcripcional, mientras que el efecto del PMA (mitógenos) sobre las HSP se verifica por un mecanismo post-transcripcional que estabiliza el mRNA.

Downs y colaboradores (182) han detectado pequeñas HSP en mitocondrias de células PC12 de ratas sometidas a calor: las cuales no aparecen en controles sin el tratamiento térmico. La inactivación funcional de estas HSP pequeñas con el anticuerpo murino HSP25, ha indicado que estas HSP protegen la NADH:ubiquinona oxidoreductasa y la NADH deshidrogenasa (complejo I mitocondrial) en vesículas submitocondriales durante el estrés oxidativo y el choque térmico. Estos datos son de gran interés ya que:

- a) Confirman la existencia de HSP de pequeño tamaño en mamíferos e indican que varias de ellas se hallan asociadas a las mitocondrias,
- b) Muestran la existencia de una función conservada entre las HSP mitocondriales de plantas y mamíferos, que protegen el transporte electrónico durante el estrés, y
- c) Proponen que estas HSP pueden jugar un papel importante en enfermedades cuya etiología se basa en el daño oxidativo al complejo I mitocondrial.

Como se ha indicado anteriormente el estrés oxidativo se ha identificado como inductor de la respuesta al estrés. Se sabe que los intermediarios reactivos del oxígeno lesionan las macromoléculas celulares. El radical hidroxilo puede oxidar las cadenas laterales de las proteínas y así inhiben su función. Sin embargo, las radiaciones ionizantes, administradas en presencia de oxígeno, son un pobre inductor de la respuesta al estrés (66). La explicación se basa en el análisis del mecanismo de formación del radical y del tipo de lesión producida en la proteína. Si un fotón pasa a través de una célula o tejido, interacciona con un átomo y se desprende un electrón, que

tiene una cantidad de energía cinética. Este electrón de alta velocidad interacciona y transfiere una fracción de su energía a otros electrones que resultan ionizados. La irradiación de materiales biológicos, en presencia de oxígeno, origina la ionización no uniforme de moléculas de agua, cuyos productos radiolíticos incluyen radicales hidroxilo y moléculas de superóxido. La radiación ionizante, administrada en presencia de oxígeno produce fragmentación de las proteínas en vez de agregación. La distribución de las ROS producidas por un fotón es diferente a la producida por sistemas catalizados por metales (reacción de Fenton). La diferencia entre la lesión producida por fotones y la producida por oxidación catalizada por metales, es que la primera se inhibe por agentes «atrapadores» de radicales, mientras que la segunda no. Por último, hay que insistir en la importancia de la formación de los agregados proteicos para la inducción de la respuesta al estrés.

4.3. NFκB

El factor nuclear κB (NFκB) es un factor de transcripción inducible de eucariotas de la familia REL, regulador crítico de la inmediata respuesta temprana a los patógenos y del sistema inmune. El NFκB juega un papel central en la regulación de muchas respuestas inflamatorias e inmunes por ser un importante modulador de la expresión de genes pro-inflamatorios. Los últimos avances en los mecanismos señalizadores que controlan la activación del NFκB y los recientes descubrimientos de la naturaleza de la quinasa IκB (IKK) representan hallazgos importantes que desvelan esta vía señalizadora.

El NF-κB existe en el citoplasma de la mayoría de tipos celulares como homo o heterodímero de una familia de proteínas relacionadas estructuralmente. Cada miembro de esta familia contiene una región N-terminal conservada, denominada dominio de homología REL, dentro de la que se encuentran los dominios de enlace al DNA, de dimerización y la señal de localización nuclear NLS. Hasta la fecha se han identificado en células de mamíferos cinco proteínas pertenecientes a la familia NFκB: p65, c-Rel, RelB, p50/105 y p52/100. Las tres primeras se producen como proteínas transcripcio-

nalmente activas y las dos últimas se sintetizan como moléculas precursoras de 105 y 100 kDa, las cuales se procesan posteriormente y dan lugar a formas activas de menor tamaño.

Los dímeros NF κ B (p50-p65) están secuestrados en el citosol de células no estimuladas, por interacciones no covalentes con una clase de proteínas inhibidoras denominadas I κ B. Estas proteínas comprenden una familia de moléculas relacionada estructural y funcionalmente. Se han identificado siete moléculas I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, p100 y p105. Todas estas proteínas contienen múltiples copias de una secuencia de 30 - 33 aminoácidos denominada anquirina. La interacción específica entre el RHD (Rel Homology Domain) y las repeticiones de anquirina es la característica que define la asociación entre el factor y su inhibidor (NF κ B-I κ B). Mediante estas asociaciones, el I κ B enmascara la secuencia de localización nuclear (NLS) del NF κ B y previene su translocación nuclear. Las señales que inducen la actividad del NF κ B causan la disociación y subsiguiente degradación de la proteína I κ B, lo que permite al dímero NF κ B, una vez liberado del I κ B, entrar en el núcleo, unirse al DNA e inducir la expresión génica. La función del NF κ B puede compararse a la de un segundo mensajero por su capacidad de transducir señales desde el citoplasma al núcleo en células activadas.

Dada su ubicua expresión no sorprende que el NF κ B juegue un papel importante en la expresión de un gran número de genes inducibles. Muchos de estos genes son importantes para la respuesta celular al estrés, lesión e inflamación.

Los inductores del factor de transcripción NF κ B son:

- a) Las citoquinas IL-1, TNF, LPS, el RNA de doble cadena y la proteína Tax del virus de la leucemia humana (HTLV-1); y
- b) Los estímulos necrogénicos y apoptogénicos tales como las ROS, UV y radiación gamma.

Esta diversidad de inductores del NF κ B subraya la capacidad de las numerosas vías de transducción de señales que emanan de una amplia variedad de mecanismos de inducción, que convergen en un solo objetivo, el complejo citosólico NF κ B-I κ B (183)

Una característica importante de la respuesta al estrés es su capacidad para inhibir transitoriamente la expresión génica de proteínas no relacionadas con el estrés. Este efecto inhibitorio se ha demostrado que es cierto con respecto a la expresión de genes proinflamatorios. Por ejemplo, la respuesta al estrés inhibe la expresión de citoquinas en células mononucleares (22) y fibroblastos (5), y la inducción mediada por citoquinas de la expresión de la óxido nítrico sintasa en hepatocitos en cultivo (6). Wong y Wispel (184) han estudiado en células A549 (línea celular epitelial de carcinoma de pulmón), los efectos de la respuesta al estrés sobre la traslocación nuclear del NFκB. Estos autores han observado que la traslocación del NFκB al núcleo disminuye por efecto de la respuesta al estrés, por dos mecanismos diferentes: inducción y estabilización de la expresión del IκBα. El resultado de estos dos efectos impide la traslocación del NFκB al núcleo. Las proteínas implicadas en la respuesta al estrés funcionan como carabinas moleculares, estabilizando y replegando las proteínas intracelulares durante el estrés (1). Por tanto, es posible que las proteínas del estrés estabilicen al IκBα por interacciones directas proteína-proteína. Feinstein y colaboradores (25), han descrito que la HSP70 puede estar implicada en este proceso, ya que al incrementar la expresión de la HSP70, por transferencia genética dirigida por plásmido, disminuyó la traslocación al núcleo del NFκB. Para explicar los efectos reguladores de la respuesta al estrés, se ha propuesto que los componentes de esta respuesta son los que estabilizan al IκBα, impidiendo que se disocie del NFκB. La estabilización del IκBα, previene su degradación y la traslocación del NFκB al núcleo, bloqueando así sus efectos reguladores sobre la transcripción. La respuesta al estrés también actúa elevando la expresión del mRNA del IκBα mediada por el TNFα. Este efecto puede proporcionar una cantidad adicional de IκBα en el citosol, que ha de actuar impidiendo la traslocación del NFκB. Dada la importancia del NFκB como efector de la expresión de genes proinflamatorios, parece que éstos efectos, la expresión del IκBα y la estabilización de su mRNA y pueden ser una parte de la función protectora de la respuesta al estrés.

A nivel clínico se está estudiando con profundidad la intervención de las HSP sobre los mecanismos pro-inflamatorios mediados por el NFκB. Las células epiteliales respiratorias son las células más

lesionadas en enfermedades inflamatorias del pulmón y las que se encuentran más implicadas en la iniciación y el mantenimiento de la inflamación a través de la producción de mediadores pro-inflamatorios. Por otro lado, el proceso inflamatorio retrasa la reparación normal de las células epiteliales, después de una enfermedad pulmonar, lo cual es crítico para la restauración de la función del órgano. Yoo y colaboradores (185) han demostrado que las HSP cuando se inducen en estas células, inhiben la expresión de citoquinas pro-inflamatorias *in vitro*. La liberación de citoquinas pro-inflamatorias se asocia con lesión de las células endoteliales y epiteliales del pulmón, lo que significa que una atenuación de la expresión de tales citoquinas, por inducción de las HSP, ha de ejercer un efecto citoprotector. Como la transcripción de la mayoría de las citoquinas pro-inflamatorias depende de la activación del NF- κ B, la supresión de estas citoquinas por las HSP se ha de encontrar estrechamente relacionada con el bloqueo de la activación del NF- κ B. Un posible mecanismo por el cual el choque térmico interfiere con la activación del NF- κ B es que la HSP70, que también se trasloca al núcleo, impida la traslocación nuclear del NF- κ B compitiendo por el acceso a los complejos del poro nuclear a través de los cuales se transporta el NF- κ B. Considerando el hecho de que el NF- κ B necesita la degradación del inhibidor I κ B α , una segunda posibilidad es que la HSP70 ejerza sus efectos sobre el NF- κ B a través del I κ B α . Estos autores consideran que el bloqueo de la activación del factor de transcripción NF- κ B, es secundario a la estabilización del inhibidor I κ B α . El primer paso en el proceso de degradación del I κ B α es la fosforilación de este inhibidor, la cual puede ser inhibida por las HSP. Los mecanismos de esta interferencia no están aún claros, pero como la fosforilación del I κ B α tiene que estar en equilibrio entre las actividades de la quinasa IKK y de la fosfatasa, una disminución del I κ B α fosforilado, por efecto de la HSP70, ha de ser debida a la inactivación de la IKK o a la activación de la fosfatasa. Se ha llegado a especular que la carabina molecular HSP70 puede unirse a la IKK para bloquear su actividad quinasa.

Las vías señalizadoras implicadas en el sistema NF- κ B/I κ B inducidas por el TNF α y la IL-1 β implican diversos caminos. La estimulación por TNF α recluta al factor asociado al TNF (TRAF-2) y a la proteína que interacciona con el receptor TNF (RIP), mientras que

la IL-1 β utiliza la proteína accesoria del receptor de la interleuquina-1 (IL-1R) y la quinasa asociada a ese mismo receptor, IRAK, para transmitir señales al TRAF-6. Las vías TNF α y la IL-1 β convergen en la quinasa inducida por el NF κ B (NIK) o en la IKK. Sin embargo, como la inducción previa de las HSP bloquea la fosforilación del I κ B inducida por el TNF α y la IL-1 β , activando la IKK, parece probable que la inducción de las HSP interfiera con una señal común, anterior o paralela a la IKK. Alguna otra acción, además de la inhibición de la IKK, puede considerarse también implicada en el mecanismo que controla el bloqueo de la fosforilación del I κ B. La asociación del I κ B con el NF- κ B se verifica por interacción de los dominios anquirina del I κ B con sitios NLS del NF- κ B. Una serie de análisis mutacionales han confirmado la presencia de una región de localización nuclear en la HSP70 humana, por tanto, se puede proponer que la HSP70 interacciona con los dominios de anquirina presentes en el I κ B. Obviamente, tal interacción puede entorpecer la fosforilación del I κ B.

Este estudio (185) demuestra que la inducción de las HSP inhibe la producción de citoquinas inflamatorias y bloquea la activación del factor de transcripción nuclear, el NF- κ B, en células epiteliales respiratorias. Este efecto inhibitorio puede relacionarse con la estabilización del I κ B α , posiblemente mediante la prevención de la activación de la quinasa específica del I κ B α , la IKK. El efecto protector de las HSP se ha demostrado también en un modelo *in vivo* de lesión aguda de pulmón, lo que lleva a la conclusión que la inducción de las HSP puede ser utilizada como una modalidad terapéutica en enfermedades agudas de pulmón.

De todo lo anteriormente expuesto puede proponerse, por tanto, que las HSP actúan impidiendo la traslocación al núcleo del NF- κ B por diferentes mecanismos, tales como:

1. Elevando la expresión del gen que codifica el I κ B;
2. Estabilizando el mRNA I κ B;
3. Previendo la degradación del I κ B al impedir su fosforilación por inhibición de la quinasa IKK; e
4. Impidiendo la traslocación del NF κ B al núcleo al competir la HSP70 por el complejo del poro nuclear.

5. PROYECCIONES CLÍNICAS Y TERAPÉUTICAS

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 numerosas 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 α -1-antitripsina en muchas hemoglobinopatías. En la talasemia, el exceso de cadenas de globina precipita en forma de inclusiones que distorsionan notable-

Enfermedades neurodegenerativas con inclusiones intracelulares asociadas a ubiquitina-proteosoma (141)

<i>Enfermedad</i>	<i>Inclusión</i>	<i>Constituyente principal</i>
Alzheimer	Marañas neurofibrilares	Tau
Parkinson	Placas	β -amiloide
Esclerosis lateral amiotrófica	Cuerpos de Lewy	α -sinucleína, cristalinas
<i>Trastornos poliglutamina</i>	Esqueña, cuerpos Bunina	SOD, neurofilamentos
Huntington	Nuclear, citosólica	huntingtina
Ataxias espinocerebelares	Nuclear, citosólica	ataxinas
Atrofia muscular espinobulbar	Nuclear, citosólica	receptor de andrógeno

mente la forma de los eritrocitos (186). Características típicas de muchas enfermedades neurológicas, son las inclusiones intracelulares de proteínas desnaturalizadas. Entre estas cabe citar, la esclerosis lateral amiotrófica, las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, y diversas enfermedades hereditarias causadas por expansiones de poliglutamina (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. Por ejemplo, estas inclusiones contienen componentes de la vía degradativa ubiquitina-proteosoma y también carabinas moleculares, unos y otras representan los dos sistemas principales que protegen a las células eucariotas del acúmulo de polipéptidos anormales no correctamente plegados.

A estas enfermedades neurodegenerativas cabe también aplicarles el término enfermedades conformacionales, ya que esta denominación se ha referido originalmente a alteraciones en la agregación de proteínas mal plegadas. Entre éstas se clasifican algunas de las anteriormente citadas: enfermedad de Alzheimer, la de Creutzfeldt-Jacob, la deficiencia severa de α -1-antitripsina con enfermedad hepática, y las enfermedades causadas por expansión de poliglutamina, como la enfermedad de Huntington. Sin embargo la definición puede ampliarse para incluir enfermedades en las cuales las proteínas mal plegadas no se agregan, pero ejercen efectos negativos al inhibir la función propia de proteínas asociadas, como ocurre en la cardiomiopatía hipertrófica, en las enfermedades de la queratina y en las enfermedades donde el mecanismo principal es la mayor degradación de los intermediarios plegados y de las proteínas mal plegadas. Los errores innatos del metabolismo pertenecen a esta última categoría. Otro grupo más de enfermedades conformacionales, que han emergido en los últimos años es el de las enfermedades en las cuales el defecto no está en el procesamiento de una proteína mutante, sino en un componente de alguno de los sistemas de control de calidad de las mismas proteínas. Estas enfermedades no pueden ser clasificadas en uno de los grupos antes mencionados porque, depen-

diendo de la carabina o proteasa específica que es defectiva, puede ocurrir un efecto pleiotrópico en diferentes proteínas (187).

En los últimos años se han descubierto una serie de enfermedades genéticas en las cuales las proteasas, las carabinas o sus cofactores están afectados por mutaciones.

La exposición de las células a elevaciones de temperatura, de 37°C a 42°C, a radicales de oxígeno, a metales pesados o a ciertos antibióticos, aunque representan agresiones muy diferentes, comparten la capacidad de causar lesión severa a las proteínas. No sorprende, por tanto, que hayan surgido mecanismos comunes, a lo largo de la evolución, que capacitan a la célula para resistir mejor a diversas agresiones físicas y químicas. Las células responden a estas condiciones adversas activando una serie de genes que codifican las proteínas del estrés, las cuales funcionan como la defensa celular principal frente a la acumulación de proteínas alteradas o proteínas mutantes. Entre estas proteínas del estrés se encuentran:

- a) Las carabinas moleculares anteriormente mencionadas, las cuales funcionan evitando la desnaturalización y la agregación de las proteínas;
- b) Diversos enzimas antioxidantes, que reducen el daño oxidativo infligido a las proteínas celulares; y
- c) Componentes de la vía ubiquitina-proteosoma, que catalizan la degradación selectiva de aquellas proteínas alteradas, nucleares o citosólicas, que no pueden ser reparadas (155, 188).

5.1. Enfermedades neurodegenerativas

Un peligro continuo para el funcionamiento y viabilidad celular es la acumulación intracelular de proteínas anormales. Las estructuras proteicas una vez formadas, son poco estables y en el medio reactivo celular, pueden sufrir fácilmente la desnaturalización y modificaciones químicas por oxidación, isomerización o glicosilación. La velocidad de tales agresiones se eleva notablemente cuando las células se someten a temperaturas elevadas, a especies reactivas

de oxígeno o a metales pesados (especialmente el mercurio). Las anomalías en la conformación de los polipéptidos pueden ser resultado de mutaciones que previenen bien el plegamiento normal o la asociación de un polipéptido con otras subunidades o cofactores estabilizadores. La acumulación intracelular de proteínas no adecuadamente plegadas puede ejercer efectos perniciosos sobre la función celular. Por tanto, las células han de dedicar gran cantidad de su energía para asegurar que las proteínas se expresen con precisión, se plieguen correctamente y se ubiquen en el compartimento celular apropiado. En caso de que la conformación normal se pierda por mutaciones o lesiones post sintéticas, las células han generado mecanismos que previenen la agregación de las moléculas no convenientemente plegadas, replegándolas, y si esto no fuera posible, hidrolizándolas a aminoácidos.

*Proteínas anormales que se degradan
por la vía ubiquitina-proteosoma (141)*

1. Proteínas incompletas
2. Proteínas mal plegadas (por mutaciones y errores en la biosíntesis)
3. Proteínas desnaturalizadas
4. Subunidades libres de complejos multiméricos
5. Proteínas que no pueden unirse a sus cofactores
6. Proteínas lesionadas por oxidación
7. Proteínas secretoras o de membrana que no son capaces de plegarse en el retículo endoplásmico
8. Proteínas no ubicadas en el compartimento correcto

Estos sistemas presentan un gran interés clínico, ya que un exceso de polipéptidos no plegados adecuadamente, en el núcleo o en el citosol puede alterar las funciones celulares y desencadenar la apoptosis.

En el caso de que la capacidad de la célula para degradar o replegar el exceso de polipéptidos anormales sea insuficiente, las

moléculas desnaturalizadas o parcialmente plegadas se acumulan y tienden a agregarse. Eventualmente forman inclusiones de gran tamaño que pueden sedimentar por centrifugación a 5.000g e incluso observarse al microscopio óptico. Casos más dramáticos aún se han observado en *Escherichia coli* cuando se expresan proteínas extrañas en grandes cantidades o cuando tales células incorporan análogos de aminoácidos en las proteínas. Los polipéptidos resultantes forman inicialmente pequeños agregados, que van uniéndose en inclusiones densas que ocupan hasta el 30% del citosol. Un proceso similar se ha detectado en reticulocitos expuestos a análogos de aminoácidos y a mercurio (un poderoso desnaturalizante) y en ciertas hernoglobinopatías. Estas inclusiones son el resultado de la tendencia inherente de las proteínas desnaturalizadas a asociarse para formar agregados insolubles. La formación de inclusiones en las células de mamíferos es un proceso más complejo y multiescalonado, en el cual se encuentra involucrada una maquinaria enzimática activa (189), que implica el transporte de pequeños agregados desde la periferia de la célula al centrosoma a lo largo de los microtubulos. Estas inclusiones se asocian con las HSP, con las proteínas ubiquitinadas, con los enzimas que conjugan la ubiquitina, con el proteosoma 26S, etc., y forman grandes estructuras denominadas «agresomas» (190). En estos agresomas puede encontrarse también proteínas mutadas de membrana, tales como las variantes CFTR de la fibrosis quística y la presenilina-1 mutante asociada con la enfermedad de Alzheimer.

Es interesante destacar que la formación del agresoma se acelera en presencia de inhibidores de la actividad del proteosoma, que se adicionaron experimentalmente, para bloquear la degradación de los polipéptidos anormales (191, 192). 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 proteosomas en complejos degradativos no funcionales. Es incluso posible, que esta forma de atrapar los proteosomas en tales estructuras, reduzca la

capacidad total de las células para verificar el recambio (turnover) proteico.

En enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Huntington, las ataxias espinocerebelares, la enfermedad de Alzheimer y las enfermedades priónicas, las inclusiones implican interacciones proteína-proteína que son especialmente estables debido a la formación masiva de estructuras beta, que se mantienen unidas por múltiples enlaces de hidrógeno (193). Además, en las enfermedades poliglutamínicas algunos polipéptidos agregados pueden entrecruzarse covalentemente por acción de la transglutaminasa. 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. De hecho, en modelos experimentales se ha observado, que las proteínas se encuentran en las inclusiones en un estado dinámico, siendo continuamente reemplazadas por otras moléculas desdobladas. Por ejemplo, en ratones transgénicos, la inducción de la huntingtina, conduce a la formación de cuerpos de inclusión y neurodegeneración, pero si posteriormente se previene la expresión de la huntingtina, los cuerpos de inclusión desaparecen por proteolisis y revierten los síntomas de la enfermedad (194). De la misma forma, en células tratadas con un inhibidor del proteosoma, se acumulan en el agrosoma formas de vida corta de la nucleoproteína del virus de la gripe, pero cuando se elimina el inhibidor desaparecen rápidamente las proteínas víricas de estas estructuras (191). Las proteínas insolubles ubiquitinadas son también digeridas directamente por el proteosoma o sufren la solubilización, mediada por las carabinas moleculares, seguida de la proteólisis proteosómica. En cualquier caso, el agrosoma puede funcionar como un compartimento 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 condiciones patológicas progresivas, siempre que el equilibrio patogénico entre la generación de proteínas anormales y su eliminación pueda alterarse.

En condiciones en las que se inhibe la actividad del proteosoma, una gran fracción de carabinas celulares y proteosomas se encuen-

tra también en el agrosoma (189). Así que, cuando la cantidad de proteínas anormales sobrepasa la capacidad de la maquinaria protectora celular, la célula estresada las coloca en un compartimento especial, junto con las carabinas y el proteosoma, en el cual los polipéptidos anormales potencialmente tóxicos pueden ser resolubilizados, replegados o señalados para la degradación. Por el contrario, en células no estresadas, donde las carabinas y el proteosoma están dispersos por todo el citosol y el núcleo, el replegamiento o la degradación de la mayoría de las proteínas, tiene lugar fuera del agrosoma. Esta segregación de las moléculas mal plegadas en el agrosoma puede reducir la amenaza a la homeostasis celular, limitando la capacidad de esas proteínas a asociarse con otros constituyentes celulares, como polipéptidos nacientes, membrana celular, etc., lo cual podría alterar diversas funciones celulares.

Protección neural por carabinas moleculares

Sobre la base de hallazgos obtenidos en células que expresan diversas proteínas anormales, parece probable que las HSP, especialmente la HSP70 y su cofactor, la HSP40 (Hdj1), jueguen también importantes papeles en las neuronas que expresan proteínas mutantes con expansiones de poliglutamina. Se ha observado en modelos de enfermedades humanas en *Drosophila*, que la sobreexpresión de las HSP70 y HSP40 protegió notablemente las neuronas de la mosca que expresaban formas mutantes de huntingtina humana (195). En cultivos de neuronas procedentes de pacientes con atrofia muscular espinobulbar, la expresión de las HSP70 y HSP40, impidió la apoptosis inducida por los agregados tóxicos formados por el receptor de andrógeno truncado y por expansiones de poliglutamina (196). De igual manera, la sobreexpresión de HSP104 en *Caenorhabditis elegans* redujo notablemente la neurotoxicidad de la huntingtina mutante (197).

Los mecanismos posibles por los cuales estas carabinas pueden proteger a las neuronas son los siguientes:

1) Las HSP ayudan a combatir la tendencia de la huntingtina y la ataxina a desdoblarse y agregarse. De hecho, en levadura, las cara-

binas moleculares disminuyen la formación de cuerpos de inclusión por fragmentos de huntingtina con poliglutamina expandida (198). Los fragmentos de huntingtina forman dos tipos de agregados, bien fibrillas similares a las del β -amiloide, que se resisten a la solubilización por detergentes iónicos SDS, o estructuras amorfas, que se solubilizan por detergentes. La HSP70 y la HSP40 pueden unirse a las moléculas solubles y facilitar la formación de agregados amorfos, a la vez que previenen la formación de estructuras fibrilares (141).

2) Las especies anormales, solubles o agregadas, sirven de núcleo donde se asocian otras proteínas parcialmente plegadas y de esa manera inhiben el correcto plegamiento de polipéptidos recién sintetizados. Las HSP pueden unirse a estas especies anormales y disminuir tales interferencias.

3) Las carabinas moleculares, además de asociarse con las especies agregadas para promover su solubilización, se unen preferentemente a las moléculas solubles con extensiones de poliglutamina, previniendo así que interactúen con otras proteínas, lo cual desencadenaría la apoptosis y la neurodegeneración.

4) Las HSP pueden también facilitar la ubiquitinación y la degradación de la huntingtina y las ataxinas, como lo hacen la HSP70 y la HSP40 para ciertas proteínas anormales. Otras carabinas pueden también contribuir a estos efectos. Por ejemplo Sherman y Goldberg (141), han encontrado que la HSP104 es esencial para la degradación de ataxina-1.

5) Finalmente, la HSP70, al inhibir la actividad de la JNK quinasa, puede directamente inhibir la capacidad apoptogénica de los polipéptidos mutantes.

La pérdida de capacidad para inducir las HSP en el envejecimiento, es uno de los factores más importantes que determinan la aparición de muchas enfermedades neurodegenerativas en la senectud, ya que las proteínas mutantes o anormales tienen tendencia a acumularse y a desencadenar la apoptosis de las neuronas. Es interesante destacar, que las células infectadas con la proteína priónica mutante, tienen disminuida su capacidad de inducir las HSP, lo cual

incrementa la vulnerabilidad a la apoptosis inducida por los priones (199, 200). También, las mutaciones en la *presenilina1*, que causan la enfermedad de Alzheimer temprana, reducen la capacidad de las neuronas para inducir la expresión de las carabinas moleculares en el retículo endoplásmico (201). Este defecto puede contribuir a la mayor producción del péptido β -amiloide en estas células y a la mayor susceptibilidad de dichas células a la apoptosis y a la neurodegeneración.

Parece probable, por tanto, que en algunas fases de la enfermedad, la respuesta al estrés se active, como parte de la respuesta celular a la acumulación intracelular de proteínas anormales. Sin embargo, no se posee información fidedigna sobre los niveles de expresión de las HSP en las neuronas durante la progresión de estas enfermedades. Este problema, aún sin resolver, es de importancia apreciable, ya que un tratamiento que causara la inducción de las HSP, podría representar un gran logro para la terapia de las enfermedades neurodegenerativas

5.2. Oncogénesis y Cáncer

La capacidad de las HSP de modular la respuesta al estrés, presenta también implicaciones terapéuticas en lo que se refiere al cáncer. Las células derivadas de una amplia variedad de tumores expresan concentraciones atípicas de una o varias HSP (202, 203). Tales observaciones han llevado a proponer que las alteraciones en los niveles intracelulares de las HSP pueden ser consideradas unos biomarcadores útiles en el diagnóstico del cáncer. Por ejemplo, la expresión de las HSP en cáncer mamario o gástrico, se asocia con prognosis pobre y resistencia a la quimioterapia o radioterapia. (184, 203, 204, 205,). La sobreexpresión de las HSP se ha asociado con una mayor supervivencia de las células tumorales frente a la quimioterapia (206). La elevada expresión de la proteína de multiresistencia (MDR), cuyo correspondiente gen contiene un elemento apropiado del choque térmico, es la causante del desarrollo de la resistencia a las terapias antineoplásicas.

Expresión alterada de los genes HSP

En un número considerable de células cancerosas, se han detectado concentraciones de HSP27 superiores a las de células no transformadas (202, 207). Además, el tipo de fosforilación de la HSP27 en células tumorales, es distinto y característico comparado con el de las células en cultivo primario no transformadas. En base a estas consideraciones, se ha propuesto que la diversidad en la fosforilación de la HSP27 representa un marcador tumoral útil. El gen *hsp27*, que contiene un elemento que responde a estrógenos (208), puede ser inducido por estas hormonas en tejido mamario. Sin embargo, la relación entre la regulación por estrógenos de la expresión del gen *hsp27* y la expresión aberrante en tumores que responden a la hormona, no puede considerarse como pronóstico de respuesta al tratamiento hormonal, ya que solo un subgrupo de tumores de mama estrógeno-positivos expresan altos niveles de HSP27.

Se han detectado expresiones elevadas de miembros de la familia HSP70 en tumores con un elevado grado de malignidad (205, 209, 210, 211). En tumores de mama, la mayor expresión del gen *hsp70* se asocia con supervivencia corta, metástasis y prognosis pobre entre los pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia, combinadas con hipertermia (212, 213). Otros miembros de la familia genética HSP (HSP90 α , HSP90 β y HSP60), se expresan en exceso en tumores de mama, de pulmón, leucemias y enfermedad de Hodgkin (184, 214, 215, 216). No se conocen aún las bases moleculares de esta excesiva expresión de las HSP en células tumorales y se piensa que su etiología molecular ha de estar asociada con la complejidad de la región promotora del gen *hsp70* (202). En una línea celular embrionaria humana transformada por virus, el gen *hsp70* se asocia con la presencia de un potente transactivador del adenovirus, la proteína E1A (217, 218, 219). Por el contrario, en células de carcinoma humano A431, la mayor expresión del gen *hsp90 β* se debe en parte, a amplificación genética (220)

Virus y HSP

Durante el curso de la infección vírica, la expresión de los genes *hs* se induce por activación de la respuesta al estrés. La infección

con adenovirus induce la transcripción de la HSP70 y la HSP90 mediante unión de la proteína vírica E1A al componente de la maquinaria basal transcripcional el CBP/p300 (218, 221, 222). Hasta la fecha se han identificado diversos mecanismos moleculares que utilizan ciertos virus para activar los genes del estrés, pero se desconocen los requerimientos específicos de las HSP en el ciclo de vida del virus. De hecho, se debería esperar que el estallido rápido de los componentes proteicos del virus, iría acompañado por una expresión paralela de las carabinas moleculares que aseguraran el apropiado montaje de la estructura macromolecular. Uno de los primeros ejemplos de la activación, por el virus, de las respuestas celulares al estrés del hospedador, tiene su base en que el bacteriófago lambda utiliza componentes de la maquinaria de la HSP70 (DnaK y DnaJ), para la construcción del complejo múltiproteico en el origen de la replicación y para asegurar la secuencia de acontecimientos de su replicación cromosómica (223, 224, 225). Este ejemplo sugiere que la respuesta celular al estrés del hospedador se pone al servicio del agente infeccioso, no solo para que éste utilice la maquinaria HSP para la formación del virus como medio para manipular la célula hospedadora, sino también para permitir al virus escapar hacia varias formas de supervivencia.

Oncogenes y p53

El virus SV40, un prototipo de oncogén vírico contiene un dominio J que corresponde a una región conservada de las carabinas moleculares DnaJ/HSP40, y es esencial para la actividad e interacciones con la maquinaria HSP70 (226). Existen evidencias que llevan a sugerir la existencia de una conexión entre las carabinas moleculares y el crecimiento celular alterado. Por ejemplo, la sobreexpresión forzada de las carabinas por transfección estable en células cultivadas o en animales transgénicos, da origen a la transformación celular y a la formación del tumor. La mayor expresión, tanto de la HSP27 como de la HSP70, eleva el potencial tumorigénico en células de hospedadores singénicos murinos, y el potencial metastático en células de cáncer mamario humano desarrolladas en ratones desnudos.

Las observaciones antes mencionadas llevan a formular la siguiente pregunta:

¿Cómo se puede explicar, que acontecimientos moleculares frecuentes durante la vida de una célula, tales como la inducción de las HSP en respuesta al estrés, o la exposición a una situación de estrés por sí misma, no conduzcan directamente al fenotipo transformado o a un riesgo mayor de transformación?

Una respuesta es, que la sobreexpresión forzada de las HSP puede complementar el fenotipo transformado, alterando las actividades de las proteínas reguladoras clave, pero esta sobreexpresión, por sí misma, es insuficiente para causar la transformación celular. El proceso de transformación celular puede utilizar componentes de la maquinaria de respuesta al estrés para alterar las conformaciones y/o las 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.

Una función posible de las HSP en la tumorigénesis es la de modificar la actividad de las proteínas, en particular, de las que forman parte de los complejos mecanismos del ciclo celular, de las quinasas y de otros implicados en la progresión del cáncer. La HSP90 interacciona con la tirosina quinasa producto del oncogen *pp60-v-src*, para formar complejos muy estables. La interacción con HSP90 altera la vida media de *pp60-v-src* y modula su actividad quinasa y su especificidad por el sustrato, conduciendo a la hipótesis que los niveles alterados de la HSP90, detectados en células tumorales, pueden asociarse con la actividad oncogénica de esta quinasa. Se ha detectado que la HSP70 forma complejos con el antígeno SV40 T grande, la proteína E1A del adenovirus, la proteína celular c-Myc y la proteína supresora de tumores p53. Tales interacciones parece que alteran la actividad de las proteínas, al cambiar la conformación proteica o la asociación con otras proteínas y también al modular su vida media, por modificación de la ubiquitinación y la

degradación. Como la proteína c-Myc se ha implicado también en la expresión del gen *hsp70*, se presupone la existencia de un mecanismo mediante cuya utilización la célula responde a los elevados niveles de c-Myc induciendo la síntesis de HSP70, que a su vez, ha de interactuar con c-Myc para inhibir su capacidad transformadora (226).

Las formas mutantes de p53 que transforman las células, se asocian con las carabinas HSP70/HSC70 localizadas en el citosol y en el núcleo. Este hecho permite sospechar que las mutaciones genéticas en p53, que afectan su conformación, utilizan la maquinaria de las carabinas para facilitar y estabilizar los estados conformacionales alterados. El tipo silvestre p53, como regulador transcripcional, es esencial para la regulación negativa del ciclo celular y la regulación de la apoptosis. Es por eso que entre los genes que son objetivo de p53, están aquellos relevantes en la función antiproliferativa de p53 como: *bax*, *hsp70* y *c-fos*. La mutación o delección de un alelo del gen *p53* y la delección de un segundo alelo, conduce a la proliferación y transformación celular y tanto una como otra, aparecen entre las alteraciones genéticas más comunes en cáncer humano. La proteína p53 mutante carece de muchas de las propiedades de la p53 silvestre y exhibe una vida media más larga, que le permite su acumulación. La acumulación de la p53 mutante se considera un marcador efectivo de pronóstico pobre en cáncer mamario y gástrico.

Se ha observado una asociación entre mutantes p53 y HSC70/HSP70, por caracterización bioquímica directa de complejos p53, aunque no se ha establecido si este acontecimiento aislado puede estar relacionado con la transformación. La mayor estabilidad de los mutantes p53 puede deberse a la formación de complejos estables con las carabinas. La sobreexpresión de HSC70/HSP70 puede suprimir la propiedad transformadora de la p53 mutante, sugiriéndose que el secuestro de la p53 mutante por la carabina molecular, podría reducir la oportunidad de asociación del tipo silvestre y el mutante, permitiendo así al tipo silvestre llevar a cabo su actividad antiproliferativa. La interacción entre la p53 mutante y las carabinas HSP70 podría también ocasionar una diversidad conformacional en p53, que influenciaría las interacciones de la p53 mutante con otros sustratos. Se ha demostrado que la actividad de unión al DNA del tipo

silvestre p53 puede ser activada *in vitro* por la HSP70 de *Escherichia coli* (227), lo cual sugiere que la activación de p53 en células normales también se desencadena por miembros de la familia HSP70. Otra proposición interesante es que la HSP70 puede participar en la presentación antigénica de la p53 mutante, asistiendo a su traslocación, desde el núcleo a la superficie celular, quizás de manera análoga al papel de las carabinas HSC70/HSP70 en la exocitosis mediada por la clatrina, en la cual la carabina puede liberarse o jugar un papel inmunogénico. Además, algunos cánceres humanos de pulmón y mama poseen anticuerpos anti p53, y pueden detectarse complejos HSP70-p53 en extractos de tejidos tumorales (228). Estudios en el futuro sobre estos mecanismos, han de ser de gran interés en el desarrollo de estrategias antitumorales dirigidas a la mayor expresión de las HSP70, como camino para suprimir la transformación inducida por p53.

5.3. Infección

La expresión de las HSP se manifiesta también durante un proceso infeccioso en el que intervienen e interaccionan un agente patógeno y el organismo hospedador. El estrés celular y la expresión de los grupos HSP65, HSP70 y HSP90 se presenta tanto en el microorganismo como en el organismo invadido. El papel de la HSP microbiana se ha estudiado intensamente en términos de inmunidad antiinfecciosa y se ha encontrado que funciona como factor de virulencia en algunos microorganismos (229, 230). Estas moléculas pertenecen también a antígenos inmunodominantes y los anticuerpos frente a las HSP bacterianas, especialmente frente a la HSP60, se encuentran muy elevados en individuos infectados o vacunados. Esto ha hecho que la evaluación de las HSP se utilice como un marcador efectivo de la vacunación (231). Mucha menor atención se ha prestado a la significación de las HSP, que se expresan en el organismo hospedador.

Las quimioquinas liberadas de los tejidos infectados conducen a la inflamación de las células del foco infectado. El tipo de inflamación se determina por el estado fisiológico del organismo hospedador y por el del microorganismo invasor. Los mediadores de la in-

flamación, principalmente los derivados del ácido araquidónico, especies reactivas de oxígeno y citoquinas, se liberan por el tejido lesionado. Exceptuando en la primera alteración del tejido por un agente infeccioso, estos mediadores toman parte en el desarrollo de la respuesta celular al estrés e inducen la expresión de las proteínas del estrés. Aunque es evidente la inducción de la expresión de los genes *hs* después de una elevada generación de ROS, la influencia de las citoquinas sobre la expresión de estos genes es variable. Las citoquinas pueden afectar dicha expresión directa o indirectamente, por ejemplo, a través de su actividad pirogénica. Esto concierne especialmente a las citoquinas IL-1 e IL-2, interferones y TNF α . (232). Se han observado numerosas relaciones entre las citoquinas y las proteínas del estrés (233, 234). Es evidente la significación de la función de estas proteínas del estrés en el desarrollo de la respuesta inmune. Se ha atribuido una función específica a la HSC78 (HSP70), en la determinación de la composición correcta de las moléculas de inmunoglobulinas. Se ha demostrado que los miembros de la familia HSP70, intervienen en el procesamiento de los antígenos y su transporte a la membrana de las células accesorias. En este aspecto se han considerado otras posibles funciones de la HSP70: transporte de los antígenos por las HSP al interior de los lisosomas para su posterior procesamiento; y transporte de péptidos antigénicos desde el citosol al interior del retículo endoplásmico, vía los heterodímeros TAP por la forma inducible de HSP72. La HSP72 puede también amplificar la formación de péptidos antigénicos estimulando la formación de complejos proteosoma, e incrementando la presentación en la membrana de los complejos principales de histocompatibilidad I con el antígeno endógeno (28, 235, 236).

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 HSP en condiciones sépticas e inflamatorias. Los efectos citoprotectores de las HSP 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, o arsenito

sódico, protege del shock endotóxico y de la sepsis. En todos estos estudios en animales, la duración de la protección fue paralela al de la expresión de las HSP. El incremento en la supervivencia de los animales se asoció con una menor lesión en hígado y pulmón y con un mayor equilibrio hemodinámico. Ha sido interesante observar que la respuesta al estrés por diferentes medios inhibe también la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible y los incrementos en los niveles séricos de TNF α , IL2 e IL6. Esto lleva a la conclusión que la respuesta al choque térmico puede modular la respuesta proinflamatoria y de esta manera proteger al animal (237). Ribeiro y colaboradores (238) han demostrado que la disminución del TNF α sérico no fue resultado de una menor síntesis de la citoquina, sino más bien de la inhibición de su liberación por los macrófagos, debida posiblemente a la unión directa de la HSP70 al TNF α . La forzada expresión de HSP70 en células de fibrosarcoma, inhibe la liberación de la citoquina por estas células, una vez que han sido estimuladas por luz UV, estrés oxidativo o IL-2 (239). Por tanto, un mecanismo por el cual la HSP70 puede servir como proteína protectora en casos de sepsis, es la inhibición de la respuesta proinflamatoria permitiendo así el mantenimiento del equilibrio hemodinámico.

Además de la inhibición de la liberación de citoquinas, la inducción de la respuesta al choque térmico se ha demostrado que produce atenuación de la apoptosis en hígado, pulmón y riñón de ratas tratadas con endotoxina (240). Este mecanismo protector puede también estar mediado por la HSP70, cuya sobreexpresión es suficiente para proteger las células endoteliales de la apoptosis inducida por endotoxina (241).

5.4. Sistema inmune

Las HSP microbianas son ubicuas y fuertemente inmunogénicas. En humanos sanos, pueden detectarse fácilmente células T y B con especificidad para las propias HSP. En pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas se han observado elevadas concentraciones de anticuerpos y células T con reactividad a las propias HSP. Sobre la base de éstas o de otras evidencias, la elevada reactividad inmune

puede ser el resultado de la inducción de las propias HSP durante la inflamación, y es posible que sea causada por la destrucción tisular. La inmunización con secuencias conservadas de la HSP microbiana, eleva la resistencia a la inducción de enfermedad autoinmune. La reactividad inmune dirigida hacia las propias HSP, puede ser parte de un mecanismo efector regulador inmune, que contribuye al mantenimiento de la auto-tolerancia y posee actividad antiinflamatoria. El estímulo de tales mecanismos antiinflamatorios efectores por inmunización artificial, ofrece atractivas posibilidades inmunoterapéuticas (242).

Inmunógenos dominantes

Diversos tipos de estrés elevan la producción de las HSP, por tanto, las células sometidas a estrés han de procesar grandes cantidades de epítopos HSP, que son presentados por sus complejos principales de histocompatibilidad (MHC). Los receptores específicos de estos epítopos HSP en células T, tienen que detectar esta elevada expresión, aunque permanezcan sujetos a los mecanismos reguladores de tolerancia periférica. Muchos otros autoantígenos son también reconocidos por el sistema inmune. Sin embargo, la frecuencia de las células inmunes que tienen receptores auto-HSP no debe ser tenida en cuenta, ya que el contacto repetido con las HSP microbianas, ha de incrementar el número de células inmunes que expresan los receptores HSP específicos microbianos. De hecho, para las HSP60 y HSP70, la inmunización con HSP microbianas desencadena la proliferación, no sólo de las células T específicas de la HSP microbiana, sino también de las células T auto-HSP de reactividad cruzada (243). Este aspecto del comportamiento inmune se encuentra conectado posiblemente con el mecanismo de control regulador del proceso inflamatorio, como se muestra en los modelos de autoinmunidad inducida experimentalmente (244).

Debido a la amplia homología de las HSP entre las especies, la respuesta inmune específica del hospedador frente a las HSP producidas por organismos procaríotas, puede inducir una reacción específica frente a los antígenos propios. La situación es complicada por el hecho de que los clones reactivos de HSP autoantigénicas, se han

descrito en individuos sanos sin una infección manifiesta, como también en individuos con enfermedad autoinmune. Ambos producen anticuerpos frente a sus propias HSP (245). Esto plantea la existencia de una relación entre la respuesta inmune frente las HSP inducidas por un microorganismo y la de las enfermedades autoinmunes. En 1988, van Eden y colaboradores demostraron (246), que los clones de linfocitos T, que fueron capaces de transferir la artritis adyuvante en animales de experimentación, fueron capaces, al mismo tiempo, de reconocer la HSP60 de micobacterias. Más tarde, se encontraron linfocitos T específicos para las HSP bacterianas y humanas en algunas enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide (247), la esclerosis múltiple, etc (248). Las respuestas inmunes, tanto humorales como celulares, frente a las HSP pueden considerarse como una simple respuesta inmune frente a proteínas extrañas, lo cual ocurre cuando esta respuesta se dirige hacia epítotos característicos de la HSP microbiana y no hacia los de la HSP del hospedador. Alternativamente, el parecido entre los epítotos HSP comunes del microorganismo y aquellos del hospedador, puede dar lugar a una respuesta inmune cruzada. La consecuencia patológica de clones autoreactivos, en asociación con enfermedades autoinmunes, se ha interpretado de diferentes maneras. Res y sus colaboradores (249) describen tres conceptos básicos de condiciones inmunopatológicas, basados en la respuesta de las células T a ambas HSP, las propias y las extrañas:

- 1) La activación de condiciones inmunopatológicas durante la reacción hacia la HSP exógena, es el resultado de una respuesta poco controlada de las células T frente a la HSP del organismo invasor. El proceso inmunopatológico puede estar causado por una respuesta defensiva del hospedador frente a la HSP exógena, lo cual se relaciona con ciertos tejidos u órganos del hospedador. Cuando el sistema inmune no diferencia correctamente los elementos propios de los extraños, se originan síntomas clínicos de enfermedad autoinmune. La forma aguda de artritis reactiva puede iniciarse por infección del tracto gastrointestinal y urogenital. Los agentes inductores de la infección pueden incluir los géneros *Chlamydia*, *Shigella*, *Salmonella* o *Yersinia*. Aunque los microorganismos nunca se aislaron del fluido sinovial en la localización de la inflamación reactiva, las células inmunocompetentes (células T) aisladas de este fluido respondieron a

los extractos de estos microorganismos con una gran proliferación (250, 251). Una reacción cruzada entre la HSP65 del patógeno invasor y la HSP65 del hospedador se considera que es la causa de la respuesta inflamatoria reactiva en infecciones con *Chlamydia*. Tales reacciones no han sido confirmadas en el caso de la HSP70.

2) Otro modelo se basa en una reacción cruzada inmunológica entre la HSP del patógeno microbiano y proteínas endógenas diferentes de las HSP. Como se mostró en el ejemplo de la artritis adyuvante en ratas, los clones de linfocitos T reactivos activados específicamente por epítomos de la HSP microbiana, sufren una reacción cruzada con proteínas de los tejidos del hospedador. Los linfocitos T capaces de transferir enfermedades responden a la HSP65 del *Mycobacterium tuberculosis*. El antígeno de la reacción cruzada en el tejido autólogo es el proteoglicano cartilaginoso (245, 252). Las conclusiones de estas observaciones permanecen en el nivel de hipótesis porque la presencia de células autoreactivas no necesita estar conectada con la etiología de las enfermedades autoinmunes.

3) La diabetes *mellitus*, dependiente de insulina, en ratones no obesos, representa otro modelo experimental de enfermedad autoinmune. La condición patológica ocurre espontáneamente en estos ratones y se asocia con la reactividad de las células T frente a la HSP65. Al contrario que en los modelos previos, este proceso no implica infección bacteriana (253).

HSP e inmunoterapia específica

Las vacunas protectoras frente a patógenos bacterianos y víricos, se basan generalmente en antígenos que son característicos de una clase dada de microorganismo y no tienen analogía estructural con el organismo hospedador. Sorprende, por tanto, que proteínas tan conservadas como las HSP, que se caracterizan por una gran homología en su secuencia, puedan ser efectivas como vacunas (254, 255). La HSP60 aislada de *Legionella pneumophila*, pertenece a las primeras vacunas de este tipo preparadas experimentalmente, y se ha observado, que la vacunación con esta proteína protege a cobayas de la infección letal con aerosol (256). Resultados similares se han

obtenido utilizando la administración preventiva de HSP60 de *Yersinia enterocolitica*. Las HSP administradas en varias vacunas con coadyuvantes, indujeron la respuesta celular inmune protectora, aunque la aplicación de proteína purificada sin coadyuvante no estimuló una reacción de defensa (257).

El efecto protector de las HSP ha sido estudiado intensamente en casos de tuberculosis. Los descubrimientos básicos fueron que las HSP10, HSP65 y HSP70 respondían a los clones de células T de pacientes con tuberculosis y por consiguiente eran candidatas para antígenos potencialmente reactivos (258). Además, la HSP65 difiere de las otras dos HSP en que está producida en niveles elevados por micobacterias, en condiciones de parasitismo intracelular. Estudios posteriores han confirmado que la HSP65 puede inducir protección inmune comparable con la vacunación BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) (259). Se ha conseguido un gran progreso usando un nuevo método de vacunación, la vacuna DNA. Las bases de esta vacunación consisten en la administración intramuscular del plásmido que contiene una secuencia genética que codifica la HSP micobacteriana. Este método de vacunación asegura una presentación del producto genético (HSP65), como un antígeno endógeno a través del MHC I (complejo principal de histocompatibilidad I) y promueve la activación de la respuesta inmune de las células T (260).

La eficiencia de la vacunación depende de la presentación del antígeno a través del MHC I (vacuna genética) o MHC II (vacunación por proteína). La vacunación por HSP65 asegura una defensa a corto plazo frente a la agresión de una cepa virulenta tal como el *Mycobacterium tuberculosis*, mientras que la vacuna DNA proporciona una protección a largo plazo, al menos 8 meses en modelo de ratón, (261, 262). Aparentemente, la causa de esta estimulación a largo plazo del sistema inmune es el antígeno codificado por el plásmido DNA. Este plásmido persiste en forma episómica en el citoplasma de células transfectadas y no se integra en los cromosomas eucariotas (263). Los mecanismos inmunes eliminan aparentemente las células que generan los antígenos endógenos lentamente.

En infecciones micóticas, las HSP, como antígenos inmunomodulantes, representan un factor significativo en la patogénesis y en la

inmunoprotección. La mayor parte de los conocimientos en este campo se han obtenido a partir de estudios de candidiasis e histoplasmosis. El papel clave en la candidiasis lo juega un producto antigénico procedente de la rotura de la HSP90, con una masa molecular de 47 kDa (264). El organismo hospedador es capaz de controlar la enfermedad o eliminar la infección fungica por anticuerpos antitumorales específicos para este antígeno. Los ratones recién nacidos tratados con anticuerpos frente a la IgM de ratón, fueron más susceptibles a la candidiasis que el grupo control y también más susceptibles que los ratones que tenían un defecto congénito o inducido en la inmunidad celular (265). La significación de la respuesta al antígeno de 47 kDa se ha verificado en suero de pacientes con candidiasis sistémica. La elevación en la concentración de anticuerpos frente a este antígeno se relaciona regularmente con una mejora del estado clínico, mientras que los anticuerpos específicos frente al antígeno de 47 kDa no se detectan en infecciones letales con *Candida* (266). Se administró profilácticamente a ratones, suero de pacientes recuperados de candidiasis sistémica, que posee una elevada concentración del anticuerpo anti-47 kDa. La tasa de muerte en estos ratones disminuyó por encima del 50%, después de la exposición a una dosis letal de *Candida albicans* (264). El mapeo del epítipo HSP90 ha demostrado que los anticuerpos protectores son específicos frente a los epítopos evolutivamente conservados, comunes para la HSP90 de humanos y de hongos, tal como el campo LKVIRK (264). Es posible predecir un mecanismo de la función protectora de anticuerpos específicos. El campo LKVIRK representa un centro multienlace de muchas proteínas y su bloqueo por un anticuerpo específico inhibe las funciones carabina de la HSP90 y puede ser fatal para el microorganismo en condiciones de estrés infeccioso.

Así como la HSP90 se considera un antígeno protector en infecciones con *Candida*, no es uniforme la opinión de los investigadores acerca de una importancia similar para la HSP70 humana (264). Bromuro y colaboradores (267) han encontrado en la HSP70 un efecto completamente opuesto sobre la respuesta inmune. Estos autores han investigado el posible efecto protector de la respuesta inmune inducida por la HSP70, frente a dos de sus fragmentos, sobre el modelo de candidiasis en ratón. Los fragmentos de la HSP70 fueron, uno de 21 kDa del terminal carboxílico y el otro de 28 kDa

del N-terminal. Los tres antígenos presentaron una fuerte actividad inmunogénica, por inducción de anticuerpos humorales y por respuesta celular inmune. Sorprendentemente, la inmunización por estos antígenos agravaron las manifestaciones patológicas de la candidiasis sistémica en el ratón. Allendoerfer y colaboradores (268) han estudiado el efecto protector de una HSP70 recombinante de *Histoplasma capsulatum*, confirmando la inducción de reacciones inmunes humorales y celulares. Sin embargo, en este caso la vacunación con proteína recombinante no tuvo tampoco significación para la defensa frente a una cepa virulenta. Por otra parte, la vacunación con una HSP60 recombinante de *Histoplasma capsulatum*, preparada por transfección de *Escherichia coli*, indujo una respuesta inmune celular que protegió a los ratones de dosis subletales del hongo administradas intranasalmente (269)

Las HSP exhiben una serie de funciones importantes en la respuesta inmune de un organismo. Las HSP65, 70 y 90 microbianas se han identificado como los objetivos más importantes para los anticuerpos y la respuesta inmune de las células T, en pacientes infectados con bacterias patógenas, hongos o parásitos. Se han evaluado epítopos de células T para las HSP65 específicas de bacterias y epítopos HSP65 conservados entre las bacterias y el hospedador. Sin embargo, nunca se han identificado epítopos selectivamente específicos para las HSP propias. Estos hechos muestran el doble papel que juega la respuesta inmune frente a las HSP. El primer papel es la eliminación de los microorganismos patógenos que derivan de clones autoreactivos y actúan rápidamente antes de que se inicien las respuestas humoral y celular frente al microbio específico. El segundo papel consiste en la eliminación de las células propias estresadas, con una concentración suficiente de HSP sobre la superficie celular. Los clones autoreactivos de células inmunocompetentes son aparentemente una parte integral del sistema inmune, que actúa como un elemento de regulación que influencia la homeostasis del sistema inmune. La expresión de las HSP propias, sirve como marcador universal de células defectivas y es un factor que sostiene la supervivencia inmune de células senescentes, malignas e infectadas (231, 235)

Enfermedades autoinmunes

La significación de las HSP en la etiología de las enfermedades autoinmunes no está completamente esclarecida. Está, de alguna manera, determinada por la forma de presentación de estos antígenos, como también por los mecanismos de tolerancia central y periférica. Las HSP por sí mismas, bacterianas o humanas, no son la verdadera causa de las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, la artritis autoinmune no ha sido aún inducida con éxito por inmunización repetida usando HSP60 de *Mycobacterium tuberculosis* (250). El papel de las HSP en la patogénesis de procesos inmunes autoagresivos, no tiene una importancia etiológica directa, pero parece depender de un marco genético o fisiopatológico. El hecho de que algunas HSP puedan ser utilizadas como antígenos inmunodominantes para la vacunación e inducción de la respuesta inmune protectora frente patógenos microbianos relevantes, subraya la importancia de su estudio más detallado en el futuro.

En muchas enfermedades inflamatorias, incluyendo las autoinmunes, se verifican respuestas de las células T y anticuerpos frente a las HSP. Aunque esta reactividad se encuentra también en individuos sanos, en alteraciones inflamatorias el nivel de reactividad es muy superior (251). Esta mayor reactividad a las HSP, se debe probablemente a la superproducción de las HSP causada por la inflamación. En enfermedades crónicas persistentes, esta elevada inmunidad refleja una respuesta inadecuada, que no puede controlar el desarrollo de la enfermedad. Hasta la fecha existe poca información para determinar si tal respuesta en humanos es insuficiente o inadecuada.

HSP60 en artritis experimental

Hace tiempo se demostró, en un modelo de artritis inducida en ratas por micobacterias, que la transferencia de la enfermedad es posible utilizando un único clon de células T frente al *Mycobacterium tuberculosis* (270). Aunque inicialmente no está claro el antígeno de la micobacteria, el clon de células T reconoció un antígeno asociado con proteoglicanos de cartílago, indicando una similitud entre el antígeno micobacteriano y el cartílago (271). Posteriores

estudios sobre el antígeno de células T productoras de artritis sobre antígenos recombinantes de micobacterias, han demostrado que la HSP60 (o la HSP65) de microorganismos, es el antígeno decisivo (245). Además, el mapeado del antígeno demostró que la secuencia de aminoácidos 180-188 es similar a la que produce el epítipo. Sin embargo, este epítipo no está conservado, por lo que el autoantígeno asociado al cartilago no es autoHSP60, sino otra molécula asociada al proteoglicano (272).

Se ha demostrado que la inmunización de ratas y ratones con HSP recombinante micobacteriano no induce la artritis, sino que protege frente a una futura inducción de esta enfermedad. El análisis de la respuesta de las células T protegidas reveló que la inmunización con HSP60 había inducido la respuesta celular a la secuencia 180-188 y también a otros epítipos. Uno de ellos resultó ser la secuencia 256-265 más conservada y se observó que las células T que respondían a este epítipo reconocían la molécula HSP60 de mamíferos (rata, ratón y humano). La transferencia pasiva de una línea celular T, que respondía a este epítipo, protegió frente a la artritis activa adyuvante inducida por micobacterias, como también frente a la inducida por el aceite artritogénico sintético, avridina. Una protección similar se ha encontrado en ratas inmunizadas con la secuencia sintética 256-265 de la HSP60 de micobacterias. Por tanto, esto parece que es un mecanismo protector fundamental, con una influencia general sobre la inflamación artrítica

Respuestas de las células T a la HSP60 en pacientes con artritis reumatoide

El análisis de la respuesta de las células T en linfocitos de sangre periférica y fluido sinovial de pacientes artríticos ha mostrado frecuencias variables de células T específicas para la HSP60. En artritis reumatoide juvenil, especialmente la oligoarticular, la respuesta a HSP60 humana recombinante es prominente, mientras que en pacientes con artritis reumatoide poliarticular, tales respuestas están ausentes. Es interesante destacar, por el contrario, que en los pacientes con artritis oligoarticular la enfermedad remite espontáneamente. De esta manera, en niños, la presencia de respuesta prolife-

rativa de las células T a la HSP60 humana puede utilizarse como un indicador de la forma de enfermedad que remite espontáneamente. La remisión va precedida también por elevada reactividad de la HSP60. Además, las células T que responden a los altos niveles de HSP60 demostraron características de una respuesta reguladora, tal como incrementada expresión de CD-30 y la producción de citoquinas inhibitorias (IL-10).

En pacientes adultos con artritis reumatoide se han obtenido evidencias indirectas de una actividad similar protectora o reguladora de las células T, que responden a la HSP60 humana. Las células T obtenidas de estos pacientes y cultivadas en presencia de IL-4, respondieron cuando se estimularon con HSP60 humana, pero no con HSP60 micobacteriana, lo que demuestra que las células que responden a la HSP60 humana son también reguladoras (Th2). Además, las células T que responden a HSP60 inhibieron la producción de TNF α , cuando se cultivaron con células sinoviales de pacientes con artritis reumatoide, que producen el mediador pro-inflamatorio TNF α (251)

La HSP60 es una señal de peligro para el sistema inmune innato

La HSP60 humana induce la producción de óxido nítrico y la síntesis de citoquinas en macrófagos (273). Esta acción estimuladora puede estar relacionada con una propiedad similar de la HSP60 bacteriana sobre las células del sistema inmune innato. Para explicar el mecanismo implicado en esta acción, deberán considerarse dos mecanismos opuestos:

- a) La HSP60 puede actuar como carabina y unirse a proteínas inmaduras o parcialmente desnaturalizadas sobre la superficie de los macrófagos o en el interior de las células después de la endocitosis. Desde aquí, la HSP60 ejercerá su misión fisiológica, sólo que el sitio de acción y las moléculas sustrato son diferentes para la HSP exógena en comparación con sus homólogos sintetizados en el interior.
- b) El otro mecanismo se basa en que los macrófagos expresen un receptor sobre la superficie celular, que reconozca un

epítipo definido de la HSP60. Este epítipo tendría que ser común entre las HSP60 bacterianas y de mamíferos, y por tanto asociado con partes muy conservadas de la molécula.

La relevancia fisiológica o patofisiológica de la respuesta inflamatoria del macrófago a la HSP60 autóloga o microbiana no se ha determinado aún. En células eucariotas, la mayor parte de la HSP60 se localiza en la mitocondria, mientras que la expresión en la superficie celular se incrementa en condiciones inflamatorias o durante la cicatrización de las heridas. Tanto la HSP60 de la superficie celular, como la de la mitocondria, se hacen accesibles durante la necrosis celular, por lo que proporcionan concentraciones locales lo suficientemente elevadas para la estimulación de una respuesta del sistema inmune innato. La HSP60 puede también liberarse de las células en forma soluble. En fluidos peritoneales de mujeres con endometriosis se ha encontrado una mayor expresión de HSP60 asociada con citoquinas proinflamatorias y macrófagos activos (273).

En monocitos o macrófagos no estimulados, la inducción de citoquinas o la producción de óxido nítrico, requiere una previa actividad transcripcional. Se supone que la HSP60 humana ejerce al menos alguno de sus efectos estimuladores a nivel de transcripción génica. Evidencias directas proceden de la observación de niveles significativamente elevados de mRNA de IL-12 e IL-15, en macrófagos expuestos a HSP60. Estas evidencias apoyan el concepto que los macrófagos responden a la HSP60 autóloga cuando ésta se hace accesible en su superficie celular. Lo mismo puede ocurrir cuando la HSP60 se libera en casos de necrosis del tejido, durante la inflamación o cuando la HSP60 se trasloca parcialmente a la membrana plasmática en respuesta a diversos tipos de estrés. La mayor expresión local de la HSP60 autóloga se ha detectado en muchas situaciones inflamatorias, tales como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn o la aterosclerosis. Se ha encontrado, además, una sobreexpresión local de HSP60 autóloga en tejidos, simultáneamente a la formación de infiltrados celulares.

La HSP60 autóloga cuando se trasloca a la superficie celular o se libera durante la necrosis celular, puede ser calificada como un antígeno peligroso (274), que alerta al sistema inmune innato a tras-

ladarse a sitios de estrés celular o necrosis. La exposición local a HSP60 da cuenta de una respuesta temprana, que eventualmente va seguida por la activación del sistema inmune adaptativo, dependiente de las células T. A este respecto es digno de mención que la HSP60 humana, no solo induce los mediadores proinflamatorios, tales como el NO o el TNF α , sino también la expresión de las IL-12 y la IL-15. Las dos últimas citoquinas juegan un papel clave en la inducción de la respuesta inmune tipo Th1 (celular) y enlaza el sistema inmune innato con la inmunidad de las células T. No sorprende, por tanto, que la HSP60 sea un antígeno clave también para las respuestas inmunes adaptativas. Esto es cierto para la defensa inmune frente a patógenos infecciosos, como también para la inflamación tisular crónica de naturaleza autoinmune. La inflamación estéril experimental inducida activa rápidamente las células T autoespecíficas de HSP60.

Chen y colaboradores (273), demuestran cómo la HSP60 humana induce una respuesta proinflamatoria en macrófagos de ratón y en monocitos humanos. La HSP60 humana promueve la generación de los mediadores proinflamatorios y de las citoquinas inductoras de Th1, lo cual identifica a la HSP60 como un peligroso antígeno para las células autólogas, ya que desencadena una respuesta inmune innata y prepara para una reacción inmune adaptativa del tipo Th1.

5.5. Fármacos, agentes tóxicos y hepatotoxicidad

Los mecanismos que intervienen en la respuesta al estrés, presentan un gran interés en el campo de la toxicología. En la actualidad, los toxicólogos tratan de utilizar los cambios en la expresión de las proteínas del estrés, en células *in vitro*, como indicadores sensibles y fiables de los efectos tóxicos de determinados xenobióticos. Mediante el recurso de las técnicas de DNA recombinante, se han construido líneas celulares «chivatas» para el estrés, que han de poder utilizarse en un futuro muy próximo para detectar riesgos biológicos. En esas células, las secuencias de DNA que controlan la actividad de los genes de proteínas del estrés se han unido a un gen que determina la síntesis de un enzima marcador, por ejemplo, la β -galactosidasa. Cuando las células experimentan algún tipo de es-

trés metabólico y producen más proteínas del estrés de lo normal, sintetizan el enzima chivato, el cual se detecta fácilmente con una prueba bioquímica. La aplicación de este tipo de tecnología es el desarrollo de animales transgénicos preparados para esa respuesta. Por ejemplo, el control del promotor de una proteína de choque térmico para conducir la expresión de un gen tal como la luciferasa o la β -galactosidasa, puede utilizarse en la monitorización de contaminantes ambientales. Aunque estas propuestas se encuentran aún en investigación, la explotación de los cambios en la expresión de las proteínas del estrés, así como de otros productos de los genes asociados con daño celular (metalotioninas, sistema del P-450), podría ser de gran aplicación en el campo de la toxicología. Las HSP pueden jugar un papel importante en la síntesis proteica, regeneración y carcinogénesis hepáticas puesto que la expresión de las HSP 25, 60, 70 y 90 se ha identificado en hígado. La HSP70 se induce en ratas hepatectomizadas y en hepatocitos proliferantes y la HSP25 se sobreexpresa en adenocarcinoma hepático (3).

Se ha estudiado el efecto de la hipertermia *in vivo* sobre la expresión y regulación de los genes *hs* en hígado, encontrándose una rápida respuesta en la transcripción de la HSP70. También se ha encontrado que la transcripción de la HSP70 se induce notablemente en la fase prereplicativa de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial, lo cual involucra a estas proteínas en las etapas tempranas de la regeneración hepática. La lesión lipoperoxidativa causada por exposición de hepatocitos aislados a 4-hidroxinonenal, induce la expresión de la proteína HSP33 dependiendo de la dosis. Estudios inmunocitoquímicos han demostrado que una de las HSP más abundantes, la HSP72, se induce en hígado de ratas por efecto de sustancias hepatotóxicas tales como el halotano. Este anestésico altera la distribución subcelular de las HSP entre citoplasma y núcleo, la cual se ha podido detectar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. El análisis por Western-blot con anticuerpos anti-HSP70, que reconocen, tanto a la forma constitutiva HSC73, como a la inducible HSP72, ha revelado que la HSP72 se induce y se trasloca al núcleo en aquellas células expuestas a halotano, previo tratamiento con fenobarbital y en condiciones de hipoxia. También se ha puesto de manifiesto que existe una relación entre la lesión oxidativa del DNA y la traslocación de la HSP70 al núcleo. Andoh y

colaboradores (275) han detectado la presencia de la HSP70 en hígado de rata con necrosis y regeneración hepatocelular inducida por tioacetamida. Con anticuerpos específicos estos autores han observado que no es en el núcleo de los hepatocitos destinados a sufrir la necrosis, donde se concentra la HSP (3, 276)

El grupo de Omar (277) ha demostrado que la HSP70, que se encuentra fuertemente asociada a estructuras citoesqueléticas que se lesionan por el etanol, aparece en hepatocitos de alcohólicos, lo que sugiere la intervención de esta HSP en la patogénesis alcohólica y en la desestabilización del citoesqueleto. La naturaleza del papel de la HSP70 no está clara, pero la presencia de otra HSP, la ubiquitina, que se conjuga con proteínas lesionadas por efecto del etanol, marcándolas para su rápida proteólisis, hace pensar en una posible implicación de la HSP70 en la eliminación de proteínas alteradas. Las proteínas citoesqueléticas lesionadas de los cuerpos de Mallory, son a menudo objetivos de la ubiquitina.

En pacientes con hepatitis alcohólica, se ha demostrado, que la HSP60 aparece en el citosol de los hepatocitos de manera difusa y que en estas condiciones de intoxicación aguda se elevan los niveles circulantes del anticuerpo IgA de la HSP60, lo cual conduce a un mecanismo patogénico que subyace en el desarrollo y progresión de la lesión hepática alcohólica (278). En este caso se demuestra, una vez más, que las HSP, normalmente protectoras, pueden ser inmunogénicas. En un estudio previo se ha identificado una HSP70 en hígado de pacientes con enfermedad hepática alcohólica, pero no se han detectado anticuerpos circulantes frente a dicha HSP70. El que las HSP se expresen en las membranas en condiciones de estrés es de importancia crítica en el contexto de un anticuerpo IgA circulante. Diversos factores que estimulan la expresión de las HSP se generan en los alcohólicos: el factor de necrosis tumoral $TNF\alpha$ y las ROS. Uno y otras se producen en áreas de inflamación. El metabolismo hepático del etanol, al elevar el consumo de oxígeno, induce una hipoxia localizada, lo cual supone un estímulo potente para la expresión de las HSP selectivamente en la región centrilobular.

Otra HSP encontrada en hígado es la HSP47, una glicoproteína cuya expresión se induce en células de mamíferos, que posee la

capacidad de unirse a colágeno nativo tipos I y IV y que en hígado se expresa en los lipocitos. Estas células, también denominadas de Ito o estrelladas, se encuentran estrechamente asociadas al metabolismo del colágeno lo que hace pensar que la HSP47 puede actuar en los lipocitos a modo de carabina molecular específica para el procolágeno. La expresión preferente de la HSP47 en estas células parece relacionarse con su capacidad para producir colágeno, ya que esta HSP no aparece en otras células hepáticas, como los hepatocitos o las células de Kupffer.

Los clofibratos son una familia de compuestos hipolipidémicos, que inducen una variedad de respuestas *in vivo*, incluyendo la proliferación de peroxisomas en células parenquimales hepáticas, la hepatomegalia y la hepatocarcinogénesis. Estos compuestos no son mutagénicos *per se*, por lo que se ha propuesto que la hepatocarcinogénesis inducida por clofibrato, puede resultar de las alteraciones metabólicas relacionadas con la proliferación de peroxisomas. En estudios en los que se aislaron proteínas de unión al clofibrato, se demostró que esta clase de compuestos interacciona específicamente con la HSP70 en sus dominios de unión al ATP o cercano a éstos. Hasta el momento se desconocen las consecuencias de tales interacciones, pero es posible que los ésteres del ftalato puedan interferir con la función de la HSP70 y por tanto, inhibir la biogénesis organular.

Como se comentó anteriormente, la inducción de los genes del estrés en las células eucarióticas tiene lugar por la unión del HSF al HSE. El HSF se activa por un choque térmico y permanece inactivo en condiciones no estresantes, probablemente por pequeñas cantidades de HSP70 constitutivamente presentes en el citoplasma. Este ejemplo de regulación negativa es bastante similar al control negativo llevado a cabo por el inhibidor I κ B sobre el factor de transcripción NF κ B. En cultivos tisulares el NF κ B puede ser activado por el H₂O₂ y otras especies de oxígeno, así como también por un choque térmico. La exposición del hígado de ratas a altas temperaturas activa además del HSF, al NF κ B, estando la activación de éste último, a diferencia del primero, mediada por la producción y liberación de IL-1. Se ha demostrado que el tratamiento con ésteres de forbol, da lugar a una resistencia, en células tumorales, a la acción citotóxica del TNF α , contribuyendo a la supervivencia de las células

tumorales *in vivo*, y se ha observado que es la HSP70 la que protege a las células tumorales de la citotoxicidad del TNF α , incluso en ausencia de estrés.

5.6. Envejecimiento

Es un hecho reconocido que las personas de edad poseen un potencial menor para adaptarse a los cambios ambientales. Esta limitada capacidad de los organismos senescentes para responder a situaciones de estrés y para mantener la homeostasis, es un fenómeno observado durante el envejecimiento en todos los organismos vivos. A medida que un organismo envejece disminuye su capacidad de respuesta a la agresión, lo cual es en gran parte responsable del incremento en la morbilidad y mortalidad en la senectud (276).

Un aspecto crucial del envejecimiento es la acumulación de lesiones, a medida que las moléculas, las células y los tejidos sufren la agresión continuada de agentes físicos o químicos a lo largo de la vida. Alguna de estas agresiones se produce de manera endógena por las mismas células lesionadas, que perpetúan así un ciclo de acontecimientos potencialmente patogénico.

Estas alteraciones pueden comprometer seriamente a los organismos senescentes respecto a su capacidad de responder a cambios en el ambiente. Por ello, el envejecimiento influye en la capacidad de las células para expresar las proteínas del estrés y así lo han demostrado los trabajos del grupo de Heydari (279) con ratas viejas, en las cuales se ha demostrado que presentan una capacidad menor para expresar la HSP70 en respuesta al calor. Debido a que el envejecimiento se caracteriza por una reducida capacidad del organismo de mantener la homeostasis en respuesta al estrés, se ha comparado la capacidad de las células viejas frente a las jóvenes, de responder a la hipertermia y expresar las HSP. En hepatocitos aislados de ratas viejas, de 26 a 28 meses de edad, se ha detectado una menor capacidad de expresar la HSP70 en respuesta a un choque térmico, siendo la síntesis de estas proteínas un 50% menor de aquella encontrada en hepatocitos aislados de ratas de 4 a 6 meses. También se ha encontrado reducida la inducción de los mRNA HSP70 y ello se debe a la menor capacidad de los hepatocitos de convertir el HSF1 inac-

tivo en su forma oligomérica activa. Las células de ratas viejas, al poseer una menor concentración de HSF activo, es menor en ellas la cantidad de HSF que puede unirse al promotor del gen *hsp70*, con lo cual resulta menor la transcripción de dicho gen. La disminución de la actividad del HSF para unirse al HSE puede surgir de una menor activación post-traducciona (oligomerización) del HSF por el agente que origina el estrés. En otras palabras, aunque en condiciones normales las cantidades de HSF en los hepatocitos aislados de ratas jóvenes o viejas son similares, en respuesta al estrés la cantidad de HSF activo, capaz de unirse al DNA, se encuentra muy disminuida en los hepatocitos de ratas viejas. Un posible mecanismo para la menor actividad de unión del HSF al HSE, es que a medida que transcurre la edad se acumule una forma de HSF «anormal».

Evidencias experimentales han mostrado que en células senescentes pueden acumularse enzimas «alteradas». Estas alteraciones surgen de cambios conformacionales, no de errores en la traducción y los cambios conformacionales en las proteínas de organismos senescentes ocurren mediante modificaciones post-traduccionales (oxidación, racemización de aminoácidos, desaminación, etc.). Estos cambios dan lugar a alteraciones sutiles que a veces no se reflejan en la actividad enzimática. Una acumulación de moléculas «anormales» de HSF, que presentan una capacidad disminuida para oligomerizarse en respuesta al estrés, puede explicar por qué las células de los organismos senescentes pierden su capacidad de responder al estrés y expresar las HSP. Esta disminución, dependiente de la edad, en la capacidad de las células a expresar HSP, puede ser uno de los factores que contribuya a la mayor incidencia de muerte en personas ancianas frente al estrés térmico o tóxico. En trabajos con ratas hembras se ha observado los mismos resultados, ya que la disminución de la expresión de las HSP por efecto del calor durante el envejecimiento se debe a una menor disposición del HSF de unirse al elemento HSE, es decir una capacidad más baja del oligómero para unirse al DNA y por tanto a una menor actividad transcripcional. La disminución dependiente de la edad, se ha detectado tanto en hepatocitos como en esplenocitos, aunque estos últimos mostraron descensos mayores. El sexo de los animales no influyó en los datos obtenidos. De todo lo anteriormente expuesto cabe concluir que la capacidad de las células/tejidos de expresar las HSP en res-

puesta al choque térmico parece ser un fenómeno universal que ocurre en la mayoría de células y tejidos y que esta habilidad se pierde paulatinamente a medida que transcurre la edad.

Como las HSP promueven el repliegamiento, solubilización y degradación de los polipéptidos alterados, la pérdida de esta respuesta ha de comprometer seriamente la capacidad celular para hacer frente a las proteínas mutantes o lesionadas, lo cual se realiza con éxito a edades más jóvenes. Estas consideraciones predicen que las neuronas de organismos envejecidos son defectivas en su capacidad de inducir las HSP cuando proteínas anormales, tales como la huntingtina, las ataxinas, la α -sinucleína, el β -amiloide, etc., tienden a acumularse. Como consecuencia de la disminuida inducibilidad de las HSP por efecto de la edad, los polipéptidos mutantes se acumulan y forman inclusiones que causan la neurodegeneración.

6. CONCLUSIONES

La mayoría de las proteínas del estrés funcionan como carabinas moleculares, lo que significa que interactúan transitoriamente con otras proteínas celulares, 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. Las interacciones de las carabinas moleculares abarcan un amplio espectro, desde el nacimiento y plegamiento de las proteínas, hasta la degradación de un polipéptido típico. Los mecanismos implicados en estos aspectos se están estudiando con gran empeño e interés, para conseguir conocimientos más profundos que puedan aplicarse a nuevos métodos de manipulación de las funciones esenciales de la célula y la producción de nuevas terapias. Existe cada vez más información acerca del comportamiento de estas proteínas y de cómo la inhibición de su expresión eleva la susceptibilidad de las células a cualquier situación adversa.

La eficacia de las carabinas moleculares Grp96, HSP70 y HSP90, para unirse a las cadenas peptídicas, parece que puede ser explotada con éxito en el aislamiento de antígenos específicos de tumores, destinados a la inmunoterapia del cáncer (252, 260, 280). A pesar de

que las carabinas son proteínas intracelulares, existen evidencias de su expresión en la superficie celular. En el caso de células tumorales, la presencia de las HSP en la superficie celular puede servir para caracterizar dichas células como objetivos específicos, mientras que en el caso de las bacterias, puede elevar su virulencia y darles la capacidad de entrar en las células hospedadoras que poseen un receptor HSP (281, 282). Se ha sugerido la existencia de un receptor HSP en células dendríticas, células decisivas profesionales presentadoras de antígenos (APC), que sirve para la iniciación de la respuesta inmune. De esta manera, las células dendríticas pueden incorporar el antígeno asociado a la HSP producida por organismos sometidos a situaciones de estrés o también por microorganismos que expresan HSP para la presentación al sistema inmune (283).

En diversos sistemas se ha demostrado que la exposición a proteínas del estrés o a sus epitopos 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 resistencia menor 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 (284). También, la administración de la carabina HSP60 hizo disminuir la inducción de artritis en ratas. Los inmunólogos están consiguiendo una aplicación clínica importante de las proteínas del estrés, en enfermedades infecciosas tales como la malaria, la tuberculosis y la lepra. Las proteínas del estrés de bacterias y parásitos son a menudo los antígenos principales del sistema inmune. Es lógico pensar en el desarrollo de vacunas frente a estos invasores, con objeto de controlar la infección. Se ha descubierto también una conexión entre las carabinas moleculares y las enfermedades autoinmunes. Para la artritis reumatoide, lupus eritematosus y espondilitis anquilosante, se han observado anticuerpos frente a las propias proteínas del estrés de los pacientes. Si estas observaciones se confirman, pueden proporcionar nuevas posibilidades de diagnóstico y terapia.

Existe un fármaco antireumático, de actuación lenta, denominado Subreum, de los Laboratorios OM (Ginebra, Suiza), que se extrae

de cepas seleccionadas de *Escherichia coli*. El Subreum se administra oralmente a pacientes con artritis reumatoide, y tiene actividad supresora de la enfermedad (255). Este fármaco contiene HSP60 y HSP70 derivadas del microorganismo y desencadena la formación de células T HSP-reactivas 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. El primer ensayo clínico en artritis reumatoide, usando estos compuestos, ha sido mediante la captura de células T. Los pacientes se trataron oralmente con un péptido derivado de DnaJ (secuencia de aminoácidos QKRAA), que es un componente de menor tamaño que la HSP70, y las células T que respondieron a este péptido fueron «capturadas» a partir de la sangre periférica usando complejos liposómicos MHC-QKRAA. No se encontró ningún efecto adverso con el tratamiento oral, mientras que las células T específicas para el péptido QKRAA fueron encaminadas hacia el fenotipo Th2 (supuestamente regulador)

Se ha estudiado también el mecanismo por el cual las proteínas del estrés ejercen un efecto citoprotector en células epiteliales respiratorias. El efecto antiinflamatorio ejercido por estas proteínas se realiza inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias, a través de la estabilización de inhibidores citosólicos que impiden la traslocación al núcleo de factores de transcripción. Estos experimentos, realizados en un modelo experimental de lesión pulmonar aguda, sugieren una modalidad terapéutica nueva para enfermedades respiratorias (185).

Es 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 *in vitro* la efectividad de la tecnología antisentido frente a las HSP70 y HSP27 (237), y se ha observado que la reducción resultante en la actividad de las respectivas proteínas, incrementa la sensibilidad de las células cancerosas

a los fármacos antineoplásicos. La inhibición de la expresión de la HSP70 por oligonucleótidos antisentido o por transferencia con adenovirus, ocasionó la apoptosis espontánea de las células cancerosas. Debido a su elevada y preferente expresión en cáncer avanzado, la HSP70 destaca como un objetivo de elección. Cuando, los inhibidores de su expresión o actividad se administran sistemáticamente, no producen efectos colaterales indeseados. Por tanto, la inhibición de la HSP70 combinada con los medicamentos antineoplásicos tradicionales, ha de mejorar la efectividad de la terapia anticancerosa y probablemente ha de permitir el uso de dosis considerablemente más bajas de los agentes quimioterapéuticos tóxicos. Los investigadores del cáncer han descubierto también interacciones reguladoras de la fosfoproteína supresora de tumores p53 sobre el promotor del gen *hsp70*. Las mutaciones en el gen *p53* se asocian con diversas formas de cáncer humano. Aunque los controles genéticos que orquestan las interacciones del gen *hs* con el *p53* son complejos, esta es una vía que puede propocionar excelentes resultados en el futuro, como posible objetivo terapéutico.

Un tema de investigación futura concierne el papel posible de las carabinas moleculares en varios estados patológicos. El defecto básico en una serie de enfermedades genéticas humanas se sabe que afectan el plegamiento y el tráfico intracelular de proteínas clave. La fibrosis quística es probablemente el ejemplo más conocido. Las carabinas moleculares pueden estar implicadas en la patogénesis de otros defectos de plegamiento proteico, incluyendo ciertas enfermedades priónicas y quizás la amiloidosis.

Final

La terapéutica es una de las áreas que destaca por beneficiarse del conocimiento de la respuesta al estrés. En cardiología, las carabinas pueden jugar un papel crítico en el progreso de la hipertrofia cardiaca y la enfermedad isquémica. Después de la trombosis coronaria las células del músculo cardiaco del paciente sufren lesión por privación del oxígeno y la reperusión posterior se acompaña por 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.

La industria farmacéutica investiga para comprender cómo los fármacos recombinantes pueden ser diseñados mejor 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.

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.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Welch WJ (1992): Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* **72**, 1063-1080.
2. Minowada G y Welch WJ (1995): Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* **95**, 3- 12.
3. Díez-Fernández C y Cascales M (1997): Proteínas del estrés y hepatotoxicidad. En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (co-ord M. Cascales) Real Academia de Farmacia/Fundación Casares Gil. Madrid, pp 157-181.
4. Wynn RM, Davie JR, Cox RP y Chuang DT (1994): Molecular chaperones: heat shock proteins, foldases and matchmakers. *J Lab Clin Med* **124**, 31-36.
5. Li GC Y Werb Z (1992): Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3218-3222.
6. Bellmann KA, Wenz A, Radons J, Burkart V, Leemann R y Kolb H (1995): Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin. *J Clin Invest* **95**, 2840-2845.
7. Jäätelä M, Wissing D, Bauer PA y Li GC (1992): Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J* **11**, 3507-3512.
8. Jakob U y Buchner J (1994): Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci* **19**, 205-211.

9. Wallt RS (1971): Genes, chromosomes and molecular evolution. En: *Biochemical evolution and the origin of life* (ed Schoffeniels E) North Holland Pub, Amsterdam. Londres, pp 14-42.
10. Lindquist SC y Craig EA (1988): The heat shock proteins. *Ann Rev Genet* **22**, 631-678.
11. Ray PK (1999): Stress genes and species survival. *Mol Cell Biochem* **196**, 117-123.
12. 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.
13. Anfinsen CB (1973): Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.
14. Ellis RJ y Hemmingsen SM (1989): Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem Sci* **14**, 339-342.
15. Ellis RJ y van der Vies SM (1991): Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **60**, 321-347.
16. Georgopoulos C y Welch WJ (1993): Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 601-634.
17. Frydman J, Nimmergern E, Ohtsuka K y Hartl FU (1994): Folding of nascent polypeptide chains in a higher molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* **370**, 111.
18. Macario AJL (1995): Heat shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Int J Clin Lab Res* **25**, 59-70.
19. Rittosa F (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571-573.
20. Theodorakis NG, Drujan D y De Maio A (1999): Thermotolerant cells show an attenuated expression of Hsp70 after heat shock. *J Biol Chem* **274**, 12081-12086.
21. Feder JH, Rossi JM, Solomon J, Solomon N y Lundquist S (1992): The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Dev* **6**, 1402-1413.
22. Schmidt JA y Abdulla E (1988): Down-regulation of IL-1 biosynthesis by inducers of the heat shock response. *J Immunol* **141**, 2027-2034.

23. Snyder YL, Guthrie L, Evans GF y Zuckerman S (1992): Transcriptional inhibition of endotoxin-induced monokine synthesis following heat shock in murine peritoneal macrophages. *J Leukocyte Biol* **51**, 181-187.
24. DeVera ME, Wong JM, Zhou JY, Tzeng E, Wong HR, Billiar TR y Geller DA (1996): Heat shock inhibits cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in rat hepatocytes. *Hepatology* **24**, 1238-1245.
25. Feinstein DL, Galea E, Aquino DA, Li GC, Xy H y Reis DJ (1996): Heat shock protein 70 suppress astroglial-inducible nitric oxide synthase expression by decreasing NF- κ B activation. *J Biol Chem* **271**, 17224-17232.
26. Wong HR, Ryan M y Wispe JR (1997): Stress response decreases NF- κ B nuclear translocation and increases I- κ B α expression in cells. *J Clin Invest* **99**, 2423-2428.
27. Lindquist SC (1986): The heat shock response. *Annu Rev Biochem* **55**, 1151-1191.
28. Burel C, Mezger V, Pinto N, Rallu M, Trigon S y Moraga M (1992): Mammalian heat shock protein families. Expression and function. *Experientia* **48**, 629-634.
29. Chaloupka K, Harper N, Krishnan V, Santostefano M, Rodriguez LV, Safe S (1993): Synergistic activity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures as aryl hydrocarbon (Ah): receptor agonists. *Chem Biol Interact.* **89**, 141-158.
30. Lis J y Wu C (1993): Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling and trucking along. *Cell* **74**, 1-4.
31. Lis J y Wu C (1994): Transcriptional regulation of heat shock genes (eds Conaway RC y Conaway JW) Raven Press, Nueva York.
32. Sorger PK. (1991). Heat shock factor and the heat shock response. *Cell* **65**, 363-36.
33. Morimoto RI (1993): Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Sciences* **259**, 1409-1410.
34. 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.
35. Morimoto RI (1998): Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Gen Develop* **12**, 3788-3796.

36. Pirkkala L, Alastalo TP, Zuo X, Benjamin IJ y Sistonen L (2000): Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway. *Mol Cell Biol* **20**, 2670-2675.
37. Liu XD, Liu PCC, Santoro N y Thiele DJ (1997): Conservation of a stress response: human heat shock transcription factors functionally substitute for yeast HSF. *EMBO J* **16**, 6466-6477.
38. Pirkkala L, y Sistonen L (1999): Antibody supershift assay is adequate for determining HSF stoichiometry in HSE complexes. *Cell Stress Chaperones* **4**, 259-261.
39. Rabindran SK, Giorgi G, Clos J y Wu C (1991): Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 6906-6910.
40. Sarge KD, Zimarino V, Holm K, Wu C y Morimoto RI (1991): Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes Dev* **5**, 1902-1911.
41. Schuetz TJ, Gallo GJ, Sheldon L, Tempst P y Kingston RE (1991): Isolation of a cDNA for HSF2: evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 6911-6915.
42. Nakai A y Morimoto RI (1993): Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, HSF3, suggest a new regulatory pathway. *Mol Cell Biol* **13**, 1983-1997.
43. Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI y Nagata K (1997): HSF4, a new member of the human heat shock family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* **17**, 469-481.
44. Mezger V, Rallu M, Morimoto RI, Morange M y Renard JP (1994): Heat shock factor 2-like activity in mouse blastocysts. *Dev Biol* **166**, 819-822.
45. Murphy SP, Gorzowski JJ, Sarge KD y Phillips B (1994): Characterization of constitutive HSF2 DNA-binding activity in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* **14**, 5309-5317.
46. Sarge KD, Park-Sarge OK, Kirby JD, Mayo KE y Morimoto RI (1994): Expression of heat shock factor 2 in mouse testis: potential role as a regulator of heat-shock protein gene expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* **50**, 1334-1343.

47. Rallu M, Loones MT, Lallemand Y, Morimoto RI, Morange M y Mezger V (1997): Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 2392-2397.
48. Alastalo TP, Lönnström M, Leppä S, Kaarnitanta K, Pelto-Hikko M, Sistonen L y Parvinen M (1998): Stage specific expression and cellular localization of the heat shock factor 2 isoforms in the rat semi-niferous epithelium. *Exp Cell Res* **240**, 16-27.
49. Sistonen I, Sarge KD, Phillips B, Abravaya K y Morimoto RI (1992): Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* **12**, 4104-4111.
50. Leppä S, Pirkkala L, Saarento H, Sarge KD y Sistonen I (1997): Over-expression of HSF2 inhibits hemin-induced heat shock gene expression and erythroid differentiation in K562 cells. *J Biol Chem* **272**, 15292-15298.
51. Leppä S, Pirkkala L, Chow SC, Eriksson JE y Sistonen I (1997): Thioredoxin is transcriptionally induced upon activation of heat shock factor 2. *J Biol Chem* **272**, 30400-30404.
52. Mathew A, Mathur SK y Morimoto RI (1998): The heat shock response and protein degradation regulation of HSF2 by the ubiquitine-proteasoma pathway. *Mol Cell Biol* **18**, 5091-5098.
53. Kim D, Kim S-H y Li GC (1999): Proteasoma inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp90 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 264-268.
54. Satyal SH, Chen D, Fox SG, Kramer JM y Morimoto RI (1998): Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Gen Develop* **12**, 1962-1974.
55. Cotto JJ, Kline MP y Morimoto RI (1996): Activation of the heat shock factor 1. DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation: Evidence for a multistep pathway of regulation. *J Biol Chem* **271**, 3355-3358.
56. Green M, Schuetz TJ, Sullivan EK y Kingston RE (1996): A heat shock-responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function. *Mol Cell Biol* **15**, 3354-3362.
57. Sarge KD, Murphy SP y Morimoto RI (1993): Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* **13**, 1392-1407.

58. 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.
59. Cotto JJ, Fox SG y Morimoto RI (1997): HSF1 granules: a novel stress-induced nuclear compartment of human cells. *J Cell Sci* **110**, 2925-2934.
60. Bosch TCG, Krylow SM, Bode HR y Steele RE (1988): Thermotolerance and synthesis of heat shock proteins: These responses are present in *Hydra attenuata* but absent in *Hydra oligactis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 7927-7931.
61. Hofmann GE, Buckley BA, Airaksinen S, Keen JE y Somero GN (2000): Heat-shock protein expression is absent in the Antarctic fish *Trematodus bernacchii* (family Nototheniidae). *J Exp Biol* **203**, 2331-2339.
62. Kanei-Ishii C, Tanikawa J, Nakai A, Morimoto RI e Ishii S (1997): Activation of heat transcription factor 3 by c-Myb in the absence of cellular stress. *Science* **277**, 246-248.
63. Tanikawa J, Ichikawa-Iwata E, Kanei-Ishii C, Nakai A, Matsuzawa S, Reed JC e Ishii S (2000): p53 supresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J Biol Chem* **275**, 15578-15585.
64. Santoro MG (2000): Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* **59**, 55-63.
65. Kauzmann W (1959): Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem* **14**, 1-64.
66. Freeman ML, Borrelli MJ, Meredith MJ y Lepock JR (1999): On the path to the heat shock response: Destabilization and formation of partially folded protein intermediates, a consequence of protein thiol modification. *Free Rad Biol Med* **26**, 737-745.
67. Kushner VP (1977): Conformational flexibility and denaturation of biopolymers. Leningrad: Nauka Press.
68. Pütsyn OB (1992): The molten globule. En: *Protein folding* (ed Creighton TE): Freeman WH & Company. Nueva York, pp 243-300.
69. Lee BS, Chen J, Angelidis C, Jurivich DA y Morimoto RI (1995): Pharmacological modulation of heat shock factor 1 by antiinflammatory drugs results in protection against stress-induced cellular damage. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7207-7211.

70. Amici C, Rossi A y Santoro MG (1995): Aspirin enhances thermotolerance in human erythroleukemic cells. An effect associated with the modulation of the heat shock response. *Cancer Res* **55**, 4452-4457.
71. Gerner EW y Schneider MJ (1975): Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* **256**, 500-550.
72. Rittosa F (1996): Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* **1**, 97-98.
73. 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.
74. Riabowol KT, Mizzen LA y Welch WJ (1988): Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* **242**, 433-436.
75. Li GC, Li L, Liu Y-K, Mak JY, Chen L y Lee WMF (1991): Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 1681-1685.
76. Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RI (1998): Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 17147-17153.
77. Wagstaff MJ, Collaco-Moraes Y, Smith J, de Bellerocche JS, Coffin RS y Latchman DS (1999): Protection of neuronal cells from apoptosis by Hsp27 delivered with a herpes simplex virus-based vector *J Biol Chem* **274**, 5061-5069.
78. Tatzelt J, Prusiner SB y Welch WJ (1996): Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J* **15**, 6363-6373.
79. 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.
80. Andrés D, Díez-Fernández C, Castrillo A y Cascales M (2002): Activation of heat shock factor is accompanied by the suppression of nuclear factor κ B activity in rat hepatocytes cultures treated with cyclosporine A. *Biochem Pharmacol* (en prensa).
81. Díez-Fernández C, Andrés D y Cascales M (2002): Protective effects of heat shock against TGF- β 1-induced apoptosis in cultured hepatocytes. *Br J Pharmacol* (en prensa).

82. Bukau B y Horwich AL (1998): The Hsp70 and Hsp60 chaperones machines. *Cell* **92**, 351-366.
83. 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.
84. Ruddon RW y Bedows E (1997): Assisted protein folding. *J Biol Chem* **272**, 3125-3128.
85. Ellis RJ y Hartl FU (1996): Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *FASEB J* **10**, 20-26.
86. Rudiger S, Buchberger A y Bukau B (1997): Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol* **4**, 342-349.
87. Zhu XT, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME y Hendrickson WA (1996): Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**, 1606-1614.
88. Parsell DA, Kowal AS y Lindquist S (1994): *Saccharomyces cerevisiae* Hsp 104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *J Biol Chem* **269**, 4480-4487.
89. Kessel M, Wu WF, Gottesman S, Kocsis E, Steven AC y Maurizi MR (1996): Six-fold rotational symmetry of ClpO, the *E. coli* homolog of the 20S proteasome, and its ATP-dependent activator, Clp Y. *FEBS Lett* **398**, 274-278.
90. Ranson NA, White HE y Saibil HR (1998): Chaperonins. *Biochem J* **333**, 233-242.
91. Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M y Buchner J (1997): Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J* **16**, 221-229.
92. Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR y Vierling E (1997): A small shock protein stably binds heat-denatured model substrate in a folding-competent state. *EMBO J* **16**, 659-671.
93. Chernoff YO, Lindquist SL, Ono B, Ingevechtomov SG y Liebman SW (1995): Role of the chaperone protein Hsp 104 in propagation of the yeast prion-like factor [ψ ']. *Science* **268**, 880-884.
94. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladburyu JE, Piper PW y Pearl LH (1997): Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 chaperone. *Cell* **90**, 65-75.

95. Bergeron JJ, Brenner MB, Thomas DY y Williams DB (1994): Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* **19**, 124-128.
96. Freedman RB (1995): The formation of protein disulphide bonds. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 85-91.
97. Fedorov AN y Baldwin TO (1997): Cotranslational protein folding. *J Biol Chem* **272**, 32715-32718.
98. Baker D y Agard DA (1994): Kinetics versus thermodynamics in protein folding. *Biochemistry* **33**, 7505-7509.
99. Zimmermann SB y Minton AP (1993): Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biomol Struct* **22**, 27-65.
100. Hartl FU (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-580.
101. Hendrick JP y Hartl FU (1993): Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* **62**, 349-384.
102. Freedman RB, Hirst TR y Tuit MF (1994): Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci* **19**, 331-336.
103. Schmid FX (1993): Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Rev Biophys Biomol Struct* **22**, 123-142.
104. Anfinsen CB, y Harber E (1961): Studies on the reduction and reformation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem* **236**, 1361-1363.
105. Chick H y Martin CJ (1911): *J Physiol* **43**, 1.
106. Wu H (1929): *Am J Physiol* **90**, 562.
107. Anson ML y Mirski AE (1931): *J Phys Chem* **35**, 185.
108. Anson ML (1945): *Adv Protein Chem* **9**, 361.
109. Eisenberg D y Schwertz GW (1951): *J Chem Physiol* **34**, 583.
110. Schellman JA (1958): *J Phys Chem* **62**, 1485.
111. Dill KA (1990): Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**, 7133-7155.
112. Goldberger RF, Epstein CJ y Anfinsen CB (1963): Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver *J Biol Chem* **238**, 628-635.

113. Levinthal C (1968): *J Chem Phys* **65**, 44-45.
114. Gething MJ y Sambrook J (1992): Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
115. Flynn GC, Pohl J, Flocco MT y Rothman JE (1991): Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BIP. *Nature* **353**, 726-730.
116. Thomas PJ, Ou BH y Pedersen PL (1995): Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem Sci* **20**, 456-459.
117. Wigley WC, Stidham RD, Smith NM, Hunt JF y Thomas PJ (2001): Protein solubility and folding monitored in vivo by structural complementation of a genetic marker protein. *Nat Biotechnol* **19**, 131-136
118. Ellis RJ y Hartl FU (1996): Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *FASEB J* **10**, 20-26.
119. Ruddon RW, Sherman SA y Bedows E (1996): Protein folding in the endoplasmic reticulum: lessons from the human chorionic gonadotropin beta subunit. *Protein Sci* **5**, 1443-1452.
120. Keller WL (1999): Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s. *Curr Biol* **9**, R305-R308.
121. Pilon M y Schekman R (1999): Protein translocation: how Hsp 70 pulls it off. *Cell* **97**, 679-682.
122. Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS y Choi EJ (2001): Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J* **20**, 446-456.
123. Buchner J (1999): Hsp90 & Co.- a holding for folding. *Trends Biochem Sci* **24**, 136-141.
124. Young JC, Moaref I y Hartl FU (2001): Hsp90: A specialized by essential protein-folding tool. *J Cell Biol* **154**, 267-273.
125. Song HY, Dunbar JD, Zhang YX, Guo D y Donner DB (1995): Identification of a protein with homology to HSP90 that binds the type I tumor necrosis factor receptor. *J Biol Chem* **270**, 3574-3581.
126. Scheibel T y Buchner J (1998). The Hsp90 complex - A super-chaperone machine as a novel drug target. *Biochem Pharmacol* **56**, 675-682.
127. Chuang SE y Blattner FR (1993): Characterization of twenty six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 5242-5252.
128. Jacob U, Muse W, Eser M y Bardwell JCA (1999): Chaperone activity with a redox switch *Cell* **96**, 341-352.

129. Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH y Schiest RH (1996): Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **14**, 5116-5121.
130. Johnson JL y Craig EA (1997): Protein folding in vivo: unraveling complex pathways. *Cell* **90**, 201-204.
131. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP y Orrenius S (1999): Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *EMBO J* **18**, 2040-2048.
132. Feder ME y Hofmann GE (1999): Heat-shock proteins, molecular chaperones and stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* **61**, 243-282.
133. Frydman J y Hartl FU (1996): Principles of chaperone-assisted protein folding: Differences between in vitro and in vivo mechanisms. *Science* **272**, 1497-1502.
134. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdall JW y Bennink JR (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770-774.
135. Glover JR y Lindquist S (1998): Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**, 73-82.
136. Amrani M., Allen NJ, O'Shea J., Corbett J, Dunn MJ, Tadjkarimi S, Theodoropoulos S, Pepper J y Yacoub MH (1993): Role of catalase and heat shock protein on recovery of cardiac endothelial and mechanical function after ischemia. *Cardioscience* **4**, 193-198.
137. Massa SM, Swanson RA y Sharp FR (1996): The stress gene response in brain. *Cerebrovasc Brain Metabol Rev* **8**, 95-158.
138. Chan PH (1996): Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* **27**, 1124-1129.
139. Kuschel L, Hansel A, Schoherr R, Weissbach H, Brot N, Hoshi T y Heinemann SH (1999): Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulphoxide reductase (hMsra): *FEBS Lett* **456**, 17-21.
140. Gabbita SP, Aksenov MY, Lovell MA y Markesbery WR (1999): Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* **73**, 1660-1666.
141. Sherman MY y Goldberg AL (2001): Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* **29**, 15-32.

142. Welch WJ (1993): How cells respond to stress. *Sci Am* **268**, 56-64.
143. Parsell DA y Lindquist S (1993): The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* **27**, 437-496.
144. Hayes SA y Dice JF (1996): Role of molecular chaperones in protein degradation. *J Cell Biol* **132**, 255-258.
145. Wickner S, Gottesman S, Skowyra D, Hoskins J, McKenney K y Maurizi MR (1994): A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12218-12222.
146. Kandror O, Busconi L, Sherman MY y Goldberg AL (1994): Rapid degradation of an abnormal protein in *Escherichia coli* involves the chaperones GroEL and GroES. *J Biol Chem* **269**, 23575-23582.
147. Ciechanover A (1994): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**, 13-21.
148. Ciechanover A y Schwartz AL (1998): The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of protein death. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2727-2730.
149. Marzella L y Glaumann H (1987): Autophagy, microautophagy and crinophagy as mechanisms of protein degradation. En: *Lysosomes: their role in protein breakdown*. H Glaumann y FJ Ballard eds. Academic Press, Nueva York, pp 319-367.
150. Dice JF, Agarraberes F, Kirven-Brooks M, Terlecky L y Terlecky SR (1994): Heat shock 70-kD proteins and lysosomal proteolysis. En: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. RI Morimoto, A Tissieres y C Georgopoulos eds. Cold Spring Harbor Lab Press, Nueva York, pp 137-151.
151. Suzuki CK, Suda L, Wang N y Schatz G (1994): Requirement for the yeast LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* **264**, 273-276.
152. Yaglom J, Linskens MHK, Sadis S, Rubin DM, Futcher B y Finley D (1995): p34^{Cdc28}-mediated control of cln3 cyclin degradation. *Mol Cell Biol* **15**, 731-741.
153. 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.
154. Hershko A y Ciechanover A (1996): The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* **61**, 761-807.

155. Hershko A. y Ciechanover A (1998): The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
156. Varshavsky A (1992): The N-end rule *Cell* **69**, 725-735.
157. Varshavsky A.(1997): The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **22**, 383-387.
158. Hershko A. (1996): Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **21**, 445.
159. DeMeester SL, Buchman TG y Cobb JP (2001): The heat shock paradox: does NF- κ B determine cell fate? *FASEB J* **15**, 270-274.
160. Moore FA y Moore EE (1995): Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin N Am* **75**, 257-277.
161. Nicholson DW (1999): Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1028-1042.
162. Cecconi F (1999): Apaf1 and the apoptotic machinery. *Cell Death Differ* **6**, 1087-1098.
163. Saibil H (2000): Molecular chaperones: containers and surfaces for folding, stabilising or unfolding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 251-258.
164. Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, Tawa P, Ruel R, Rosen A, Nicholson DW. (1999): Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J* **18**, 2049-2056.
165. Xanthoudakis S y Nicholson DW (2000): Heat-shock proteins as death determinants. *Nature Cell Biol* **2**, E163-E-165.
166. Samali A y Orrenius S (1998): Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones* **3**, 228-236.
167. Lewis J, Devir A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L y Liu Z-G (2000): Disruption of HSP function results in degradation of the death domain kinase, receptor interacting protein (RIP): and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor- κ B activation. *J Biol Chem* **275**, 10519-10526.
168. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E y Garrido C (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biol* **2**, 645-652.

169. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboudi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM y Green DR (2000): Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol* **2**, 469-475.
170. Beere HM y Green DR (2001): Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **11**, 6-10.
171. Saleh A, Srinivasula S, Balkir L, Robbins PD y Alnemri ES (2000): Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biol* **2**, 476-483.
172. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JL y Seo JS (2000): Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* **275**, 25665-25671.
173. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D y Kharbanda S (2000): Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* **19**, 4310-4332.
174. Schett G, Steiner CW, Gröner M, Winkler S, Graninger W, Smolen J, Xu Q y Steiner G (1999): Activation of Fas inhibits heat-induced activation of HSF1 and up-regulation of hsp70. *FASEB J* **13**, 833-842.
175. Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, AirneSempe C, Xie ZH, Morimoto RI y Reed JC (1997): BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J* **16**, 4887-4896.
176. Song J, Takeda M y Morimoto RI (2001): Bag1-HSP70 mediates a physiological stress signaling pathway that regulates RAF-1/ERK and cell growth. *Nature Cell Biol* **3**, 276-282.
177. Briknarova K, Takayama S, Brive L, Havert ML, Knee DA, Velasco J, Homma S, Cabezas E et al (2001): Structural analysis of BAG1 co-chaperone and its interactions with Hsc70 heat shock protein. *Nature Struct Biol* **8**, 349-352.
178. de la Rosa E, Vega-Nuñez E, Morales AV, Serna J, Rubio E y de Pablo F (1998): Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro)insulin correlates with prevention of apoptosis *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9950-9955.
179. Jäätelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T y Egeblad M (1998): Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J* **17**, 6124-6134.

180. Cascales M (1999): Respuestas celulares a la agresión oxidativa. En: *Estrés Oxidativo, Envejecimiento y Enfermedad*, Instituto de España, Madrid, pp 47-89
181. Cascales M (1999): Estrés Oxidativo, Envejecimiento y Enfermedad. Instituto de España. Madrid, pp 1-266.
182. Downs CA, Jones LR y Heckathorn SA (1999): Evidence for a novel set of small heat-shock proteins that associates with the mitochondria of murine PC12 cells and protects NADH: ubiquinone oxidoreductase from heat and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* **365**, 344-350.
183. May MJ y Ghosh S (1998): Signal transduction through NFκB. *Immunol Today* **19**, 80-88.
184. Wong HR y Wispe JR (1997): The stress response and the lung. *Am J Physiol* **273**, L1-L9.
185. Yoo C-G, Lee S, Lee C-T, Kim YW, Han SK y Shim Y-S (2000): Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of IκBa through preventing IκB kinase activation in respiratory epithelial cells. *J Immunol* **164**, 5416-5423.
186. Asakura T, Minakata K, Adachi K, Russel MO y Schwartz E (1977): Denatured hemoglobin in sickle erythrocytes. *J Clin Invest* **59**, 633-640.
187. Gregersen N, Bross P, Andresen BS, Pedersen CB, Corydon TJ y Bolund L (2001): The role of chaperone-assisted folding and quality control in inborn errors of metabolism: Protein folding disorders. *J Inherit Metab Dis* **24**, 189-212.
188. Schwartz AL y Ciechanover A (1999): The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu Rev Med* **50**, 57-74.
189. Fabunmi RP, Wigley WC, Thomas PJ y DeMartino GN (2000): Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome. *J Biol Chem* **275**, 409-413.
190. Johnston JA, Ward CL, y Kopito RR (1998): Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-1898.
191. Anton LC, Schubert U, Bacik I, Princiotta MF, Wearsch PA, Gibbs J, Day PM, Realini C, Rachsteiner MC, Bemmink JR y Yewdell JW (1999): Intracellular localization of proteasomal degradation of viral antigen. *J Cell Biol* **146**, 113-124.

192. Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, y Sztul ES (1999): Characterization and dynamics of aggregatesome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* **146**, 1239-1254.
193. Bates GP, Mangiani L y Davies SW (1998): Transgenic mice in the study of polyglutamine repeat expansion diseases. *Brain Pathol* **8**, 699-714.
194. Yamamoto A, Lucas JJ y Hen R (2000): Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* **101**, 57-66.
195. Fernandez-Funez P, Nino-Rosales ML, de Gouyon B, She WC, Luchak JM, Martinez P, Turiegano E, Benito J, Capovilla M, Skinner PJ et al., (2000): Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* **408**, 101-106.
196. Kobayashi Y, Kume A, Li M; Doyu M, Hata M, Ohtsuka K y Sobue G (2000): Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem* **275**, 8772-8778.
197. Satyal SH, Schmidt E, Kitagawa K, Sondheimer N, Lindquist S, Kramer JM y Morimoto RI (2000): Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5750-5755.
198. Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Haycr-Hartl MK y Hartl FU (2000): Hsp70 and Hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 7841-7846.
199. Tatzelt J, Zuo JR, Voellmy R, Scott M, Hartl U, Prusiner SB y Welch WJ (1995): Scrapie prions selectively modify the stress response in neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 2944-2948.
200. Tatzelt J, Voellmy R y Welch WJ (1998): Abnormalities in stress proteins in prion diseases. *Cell Mol Neurobiol.* **18**, 721-729.
201. Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y et al., (1999): Presenilin-1 mutations downregulate the signaling pathways of the unfolded protein response *Nature Cell Biol* **1**, 479-485.
202. Morimoto RI (1991): Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation and differentiation. *Cancer Cells* **3**, 295-301.

203. 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.
204. Conroy SE y Latchman DS (1996): Do heat shock proteins have a role in breast cancer? *Br J Cancer* **74**, 717-721.
205. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ y McGuire WL (1993): Heat shock protein hsp70 in patient with auxiliary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* **85**, 570-574.
206. Hann GM y Li GC (1990): Thermotolerance, thermoresistance and thermo-sensitization. En: *Stress proteins in biology and biomedicine* (eds Morimoto RI, Tissieres A y Georgopoulos C): Cold Spring Harbor Lab Press. Nueva York, pp 79-1000.
207. Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL y Fuqua SA (1993): Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27); a review. *J Natl Cancer Inst* **85**, 1558-1570.
208. Oesterreich S, Lee AV, Sullivan TM, Samuel SK, Davie JR y Fuqua SA (1997): Novel nuclear matrix protein HET binds to an influences activity of the HSP27 promoter in human breast cancer cells. *J Cell Biochem* **67**, 275-286.
209. Kaur J y Ralhan R (1995): Differential expression of 70-kDa heat shock protein in human oral tumorigenesis. *Int J Cancer* **63**, 774-779.
210. Ralhan R y Kaur J (1995): Differential expression of Mr 70,000 heat shock protein in normal, premalignant and malignant human uterine cervix. *Clin Cancer Res* **1**, 1217-1222.
211. Santarosa M, Favaro D, Quata M y Galligioni E (1997): Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role and prognosis implications in cancer patients. *Eur J Cancer* **33**, 873-877.
212. Liu FF, Miller N, Levin W, Zanke B, Cooper B, Henry M et al (1996): The potential role of HSP70 as an indicator of response to radiation and hyperthermia treatments for recurrent breast cancer. *Int J Hyperthermia* **12**, 197-208.
213. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC y Ciocca DR (1998): Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* **79**, 468-475.

214. Jameel A Skilton RA, Campbell YA, Chamder SK, Coombes RC y Luqmani YA (1992): Clinical and biological significance of HSP89 alpha in human breast cancer. *Int J Cancer* **50**, 409-415.
215. Yufu Y, Nishimura J y Nawata H (1992): High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human acute leukemia cells. *Leuk Res* **16**, 597-605.
216. Hsu PL y Hsu SM (1998): Abundance of heat shock proteins (Hsp89, hsp60 and hsp27): in malignant cells of Hodgkin's disease. *Cancer Res* **58**, 5507-5513.
217. Nevins JR (1982): Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by adenovirus E1A gene product. *Cell* **29**, 913-919.
218. Wu BJ, Hurst HC, Jones NC y Morimoto RI (1986): The E1A 13S product of adenovirus 5 activates transcripción of the cellular human HSP70 gene. *Mol Cell Biol* **6**, 2994-2999.
219. Williams GT, McClanahan TK y Morimoto RI (1989): E1A transactivation of the human HSP70 promoter is mediated through the basal transcriptional complex. *Mol Cell Biol* **9**, 2574-2587.
220. Jolly C, Michelland S, Rocchi M, Robert-Nicoud M y Voure'h (1997): Analysis of the transcriptional activity of amplified genes in tumour cells by fluorescence *in situ* hybridation. *Hum Genet* **101**, 81-87.
221. Simon MC, Kitchener K, Kao HT, Hickey E, Weber L, Voellmy R et al., (1987): Selective induction of human heat shock gene transcription by the adenovirus E1A gene products, including the 12S E1A product. *Mol Cell Biol* **7**, 2884-2890.
222. Phillips B, Abravaya K y Morimoto RI (1991): Analysis of the specificity and mechanism of transcriptional activation of the human hsp70 gene during infection by DNA viruses. *J Virol* **65**, 5680-5692.
223. Liberek K, Georgopoulos Z y Zyllicz M (1988): Role of the *Escherichia coli* DnaK and DnaJ heat shock proteins in the initiation of bacteriophage lambda DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 6632-6636.
224. Alfano C y McCracken R (1989): Heat shock protein-mediated disassembly nucleoprotein structures is required for the initiation of bacteriophage lambda DNA replication. *J Biol Chem* **264**, 10709-10718.
225. Hoffmann HJ, Lyman SK, Lu C, Petit MA y Echols H (1992): Activity of the Hsp70 chaperone complex - DnaK, DnaJ, and GrpE - in ini-

- tiating phage lambda DNA replication by sequestering and releasing lambda P protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 12108-12111.
226. 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.
227. Lane DP, Midgley C y Hupp T (1992): Tumour Suppressor genes and molecular chaperones. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* **339**, 369-372.
228. Davidoff AM, Inglehart JD y Marks JR (1993): Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3439-3442.
229. Lin J, Adams LG y Ficht TA (1992): Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of genes encoding the GroE heat shock protein *Infect Immun* **60**, 2425-2431.
230. Stulik J, Hernychova L, Macela A, Krocova Z y Kroca M (1999): Production of stress-inducible form of heat-shock protein 70 in mouse peritoneal adherent cells after in vivo infection by *Francisella tularensis*. *Folia Microbiol* **44**, 306-310.
231. Weigl E, Kopecek P, Rasca M y Hradilova S (1999): Heat shock proteins in immune reactions. *Folia Microbiol* **44**, 561-560.
232. Polla BS y Kantegwa S (1991): Heat shock proteins and inflammation. *Curr Topics Microbiol Immunol* **167**, 93-108.
233. Polla BS, Perin M, Pizurki L (1993): Regulation and function of stress proteins in allergy and inflammation. *Clin Exp Allergy* **23**, 548-556.
234. Polla BS, Bachelet M, Elia G y Santoro MG (1998): Stress proteins in inflammation. *Ann NY Acad Sci* **851**, 75-85.
235. Kaufmann SHE (1994): Heat shock proteins and autoimmunity: A critical appraisal. *Intern Arch Allergy Immunol* **103**, 317-322.
236. Wells AD, Rai SK, Salvato MS, Band H, Malkovsky M (1998): Hsp72-mediated augmentation of MHC class I surface expression and endogenous antigen presentation. *Intern Immunol* **10**, 609-617.
237. Jaätelä M (1999): Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Trends Mol Medicine* **31**, 261-271.
238. Ribczi SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD y Slutsky AS (1996): Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF-alpha posttranslational regulation. *Am J Respir Crit Care Med* **154**, 1843-1850.

239. Simon MM, Krone C, Schwarz A, Luger TA, Jäättelä M y Schwarz T (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. *J Clin Invest* **95**, 926-933.
240. Klosterhalfen B, Hauptmann S, Tietze L, Tons C, Winkeltau G, Kupper W et al. (1997): The influence of heat shock protein 70 induction on hemodynamic variables in a porcine model of recurrent endotoxemia. *Shock* **7**, 358-363.
241. Wong HR, Mannix RJ, Rusnak JM, Boota A, Zar H, Watkins SC et al. (1996): The heat-shock response attenuates lipopolysaccharide-mediated apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 745-751.
242. DeNagel DC y Pierce KS (1993): Heat shock proteins in immune responses. *Crit Rev Immunol* **13**, 71-81.
243. Tanaka S (1999): Activation of T-cells recognizing an epitope of heat shock protein 70 can protect against rat adjuvant arthritis. *J Immunol* **163**, 5560-5565.
244. Hammerling GJ, Schorich G, Ferber I y Arnold B (1993): Peripheral tolerance as a multi-step mechanism. *Immunol Rev* **133**, 93-103.
245. Burmester GM, Altstidi JR y Emrich F (1991): Stimulatory response towards the 65 kD heat shock protein and other mycobacterial antigens in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheum* **18**, 171-176.
246. van Eden W, Thole J, van der Zee R, Noordzij, van Emden J y Hensen E (1988): Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* **331**, 171-173.
247. Kaufmann SHE (1994): Heat shock proteins and immune response. *Immunol Today* **11**, 129-136.
248. Jindal S, Dudani AK, Singh B, Harley CB y Gupta RS (1989): Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol* **9**, 2279-2283.
249. Res PCM, Schaar CG, Breedveld FC, van Eden W, van Embden JDA, Cohen IR y De Vries RRP (1988): Synovial fluid T cell reactivity against the 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. *Lancet* **27**, 478-480.
250. Gaston JSH, Life PF, Bailey IC y Bacon PA (1989): In vitro responses to 65 kD mycobacterial protein by synovial T cells from inflammatory arthritis patient. *J Immunol* **143**, 2494-2500.

251. Hermann E, Fleischner B, Mayet WJ, Poralia T, Meyer ZUM y Buschenfelde KH (1989): Response of synovial fluid cell clones to *Yersinia enterocolitica* antigens in patient with reactive arthritis. *Clin Exp Immunol* **75**, 365-370.
252. van Eden I (2000): Stress proteins as targets for anti-inflammatory therapies. *Drug Discov Today*, **5**, 115-120.
253. Elias D, Markowitz D, van der Zee R y Cohen IR (1990): Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese (NOD/Lt): mouse by a 65-kD heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 1576-1580.
254. Dixon DM, Casadsevall A, Klein B, Mendoza L, Travassos L, Deepe GS (1998): Development of vaccines and their use in prevention of fungal infection. *Med Mycol* **36**, (supl 1): 57-67.
255. 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.
256. Blander SJ y Horowitz MA (1993): Major cytoplasmic membrane protein of *Legionella pneumophila*, a genus common antigen and member of the hsp family of heat shock proteins, induces protective immunity in guinea pig model of Legionnaire's disease. *J Clin Invest* **91**, 717-723.
257. Noll A y Autenrieth IB (1996): Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with yersinia hsp60 immunostimulating complex or yersinia hsp60 plus interleukin-12. *Infect Immun* **64**, 2955-2961.
258. Mendez-Sampiero P, Gonzalez-García L, Pineda-Fragoso PR y Ramos-Sanchez E (1995): Specificity of T cells in human resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cell Immunol* **162**, 194-201.
259. Silva CL y Lowrie DB (1994): A single mycobacterial protein (hsp65): expressed by transgenic antigen-presenting vaccinates mice against tuberculosis. *Immunology* **82**, 244-248.
260. Ishii T, Udono H, Yamano T, Ohta H, Uenaka A, Ono T, Hizuta A, Tanaka N, Srivastava PK y Nakayama E (1999): Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins HSP70, HSP90 and GP96. *J Immunol* **162**, 1303-1309.
261. Lowrie DB, Silva CL y Tascon RE (1997): Genetic vaccination against tuberculosis. *Springer Semin Immunopathol* **19**, 161-173.

262. Bonato VLD, Lima VMF, Tascón RD, Lowrie DB y Silva CL (1998): Identification and characterization of protective T Cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. *Infect Immun* **66**, 169-175.
263. Wolfe JA, Luyke JJ Ascadi G, Williams P y Jani A (1992): Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Human Mol Genet* **1**, 363-370.
264. Mathews RC y Burnie JP (1992): The role of Hsp90 in fungal infection. *Immunol Today* **13**, 345-348.
265. Cutler JE (1976): Acute systemic candidiasis in normal and congenitally thymic-deficiency (nude) mice.I. *Reticuloendothel Soc* **19**, 121-124.
266. Mathews RC y Burnie JP (1996): Antibodies against Candida: potential therapeutics? *Trends Microbiol* **4**, 354-358.
267. Bromuro C, La Valle R, Sandini S, Urbani F, Ausiello CM, Morelli L, Fe D'Ostiani C, Romani I y Cassone A (1998): A 70-kilodalton recombinant heat shock protein from *Candida albicans* is highly immunogenic and enhances systemic murine candidiasis. *Infect Immun* **66**, 629-634.
268. Allendoerfer R, Maresca B y Deepe GS (1996): Cellular immune responses to recombinant heat shock protein 70 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* **64**, 4122-4128.
269. Gomez FJ, Allendoerfer R y Deepe G (1995): Vaccination with heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis *Infect Immun* **63**, 2587-2595.
270. Holoshitz J, Matitiau A, Cohen IR. (1984): Arthritis induced in rats by cloned T lymphocytes responsive to mycobacteria but not to collagen type II. *J Clin Invest* **73**, 211-215.
271. van Eden W, Holoshitz J, Nevo Z, Frenkel A, Klajman A y Cohen IR (1985): Arthritis induced by a T cell clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and to proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 5117-5120.
272. Prakken BJ, Wendling U, van der Zee R, Rutten WP, Kuis W y van Eden W (2001): Induction of IL-10 and inhibition of experimental arthritis are specific features of microbial heat shock proteins that are absent for other evolutionary conserved immunodominant proteins. *J Immunol* **167**, 4147-4153.

273. Chen W, Syldath U, Belmann K, Burkart V y Kolb H (1999): Human 60 kDa heat shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* **162**, 3212-3219.
274. Matzinger P (1994): Tolerance, danger and the extended family. *Annu Rev Immunol* **12**, 991-1045.
275. Andoh H, Itoh H, Koyama K, Sato Y Tashima Y (1994): Heat shock protein 70 in rat liver with necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *J Gastroenterol* **29**, 293-298.
276. Cascales M (2001): Mecanismos de hepatotoxicidad. Real Academia de Doctores. Madrid, pp 9-304.
277. Omar R, Pappolla M y Saran B (1990): Immunocytochemical detection of the 70 kD heat shock protein in alcoholic liver disease. *Arch Pathol Lab Med* **114**, 589-592.
278. Koshinas J, Winrow VR, Bird GLA, Lan JYN, Potmann BC, Blake DR, Alexander GIM y Williams R (1993): Hepatic 60-kD heat shock protein responses in alcoholic hepatitis. *Hepatology* **17**, 1047-1051.
279. Heydari AR, You S Takahashi R, Sarge KD y Richardson A (1996): Effect of caloric restriction on the expression of heat shock protein 70 and the activation of heat shock transcription factor 1. *Developmental Genetics* **18**, 114-124.
280. Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ y McQuade KL (1998): Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* **8**, 657-665.
281. Kamiya S (1998): A virulence factor of *Helicobacter pylori*: Role of heat shock protein in mucosal inflammation after *H. pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* **27**, S35-S39.
282. Srivastava PK y Udono H (1994): Heat shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **6**, 728-732.
283. Colaco CA (1998): Towards a unified theory of immunity: Dendritic cells, stress proteins and antigen capture. *Cell Mol Biol* **44**, 93-98.
284. 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.
285. Johnston RN y Kucey BL (1988): Competitive inhibition of hsp70 gene expression causes thermosensitivity. *Science* **242**, 1551-1554.

8. AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Evangelina Palacios Aláiz, Carmen Díez-Fernández y David Andrés García, por la lectura crítica de este manuscrito, y a Dolores Velasco Pérez, por su ayuda incondicional en la preparación del texto y figuras y en la revisión de las citas bibliográficas.

9. GLOSARIO Y ABREVIATURAS

- **Agresoma**, inclusiones densas en el citosol formadas por agregación de proteínas desnaturalizadas o parcialmente plegadas. Estas inclusiones se asocian con HSP, proteínas ubiquitinadas, enzimas conjugadores de la ubiquitina, proteosoma 26S, etc.
- **Anquirina**, secuencia de 30-33 aminoácidos que en forma de dominios múltiples interacciona con sitios NLS del NFκB.
- **Apaf-1**, complejo apoptosómico compuesto de varias moléculas.
- **APC** (antigen presenting cells), células presentadoras de antígenos. Fagocito.
- **Ataxina-1**, proteína cuyo derivado mutante, típico de la ataxia espino-cerebelar posee una secuencia expandida de poliglutamina que no se puede degradar por el proteosoma 26S, a pesar de estar adecuadamente ubiquitinada.
- **Bag-1**, proteína antiapoptótica asociada a la Bcl2, cofactor de la HSC70 y la HSP70 en citosol y núcleo de mamíferos, actúa como factor de acoplamiento en la interfase entre el plegamiento y la degradación proteica.
- **BiP**, proteína homóloga de la HSP70 en el lumen del retículo endoplásmico.
- **CARD**, dominio de reclutamiento de la caspasa.
- **Citoquina**, factor humoral que al unirse a su receptor específico en la membrana celular provoca una respuesta de la célula.
- **Clatrina**, proteína que recubre las paredes de vesículas endocíticas.
- **Clp**, proteasa bacteriana dependiente de ATP.
- **Cpl**, proteína funcional en procariotas equivalente a la ubiquitina.
- **CRAG**, proteína quimérica.
- **dATP**, desoxi ATP.
- **DnaJ**, carabina molecular procariota de 43 kDa.
- **DnaK**, carabina molecular procariota de 70 kDa.

- **E1A**, proteína del adenovirus.
- **Episoma**, unidad de material genético compuesta por una serie de genes con existencia independiente o integrada en el genoma de una célula hospedadora.
- **Epítipo**, determinante antigénico. Porción de una molécula antigénica a la cual se une un anticuerpo.
- **ERK**, quinasa extracelular.
- **FAS**, factor apoptogénico, proteína de membrana.
- **GroEL**, carabina molecular bacteriana de 60 kDa.
- **GroES**, carabina molecular bacteriana de 10 kDa.
- **Grp** (glucose regulated protein), proteína regulada por glucosa.
- **HSC** (heat shock cognate), proteína del estrés expresada constitutivamente.
- **GSH**, glutation reducido, tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicocola.
- **GSSG**, glutation oxidado, hexapéptido formado por la oxidación de 2 moléculas de GSH.
- **-S-S-**, puente disulfuro.
- **HS** (heat shock), choque térmico o elevación de la temperatura.
- **HSE** (heat shock element), elemento del choque térmico. Secuencias invertidas de la serie de nucleótidos nGAAn, localizadas en el promotor de los genes que codifican proteínas del estrés.
- **HSF** (heat shock factor), factor de transcripción que, una vez en forma de trómero se une al HSE.
- **HSP** (heat shock protein), proteína del choque térmico o proteína de estrés.
- **hs**, gen que codifica las proteínas del estrés.
- **HtpG**, homólogo de la HSP90 en *E. coli* que carece de la región cargada y de la extensión C- terminal.
- **HTLV**, virus de la leucemia humana.
- **Huntingtina**, polipéptido formado por una cadena de poliglutamina.
- **I-κB**, inhibidor del factor nuclear κB, carabina molecular putativa.
- **IKK**, quinasa específica del IκB.
- **IL-1R**, receptor de la interleuquina 1.
- **IL-2**, interleuquina 2 (citoquina).
- **IL-6**, interleuquina 6 (citoquina).
- **IRAK**, quinasa asociada al receptor de la IL-1.
- **JNK**, quinasa N- terminal codificada por el proto- oncogen c-Jun.
- **kDa**, kilodaltons (peso molecular).
- **La**, proteasa bacteriana producto del que gen Lon, tetrámero dependiente de ATP.
- **Lon**, proteína funcional equivalente a la ubiquitina en procariotas.

- **LPS**, lipopolisacárido.
- **mRNA**, RNA mensajero.
- **MCH I y II**, complejos principales de histocompatibilidad I y II.
- **Mdj1**, proteína homóloga mitocondrial de la DnaJ.
- **NFκB**, factor nuclear κB.
- **NIK**, quinasa inducida por el NFκB.
- **NLS**, sitios de localización nuclear en la molécula del NFκB.
- **NO**, óxido nítrico.
- **Pim1**, proteasa mitocondrial homóloga de Lon, en levadura.
- **PKC**, proteína quinasa C.
- **Plásmido**, moléculas de DNA de pequeño tamaño y de forma circular.
- **PMA**, éster del forbol miristato acetato.
- **PMB**, polimixina B neutralizadora de la acción de la endotoxina.
- **Proteosoma**, proteasa multisubunidad dependiente de ATP.
- **Raf**, quinasa específica de serina/treonina, cofinancada por el proto-oncogen *rat* que forma parte de la cascada de quinásas inducida por Ras.
- **REL**, según N-terminal conservada del NFκB en la que se encuentran los dominios de enlace al DNA, de dimerización y la señal de localización nuclear NLS.
- **RHD** (REL Homology Domain), dominio de homología REL.
- **RepA**, proteína iniciadora del plásmido P1.
- **RIP**, proteína que interacciona con el receptor TNF.
- **ROS**, especies reactivas de oxígeno.
- **SBD**, dominio de unión al sustrato (substrate binding domain).
- **SDS-PAGE**, dodecil sulfato sódico-electroforesis en gel de poliacrilamida.
- **TAP**, heterodímero implicado en el transporte de péptidos antigénicos desde el citosol al interior del retículo endoplásmico.
- **Tc**, linfocito T citotóxico que al unirse a una célula infectada provoca su muerte.
- **TCP-1**, polipéptido complejo T, carabina.
- **Th1**, linfocito T auxiliar que se une al macrófago y provoca la respuesta inmune celular.
- **Th2**, linfocito T auxiliar que se une al linfocito B y provoca la respuesta inmune humoral.
- **TRAF1 y 2**, factores asociados a los receptores TNF 1 y 2.
- **TRAP1**, isoforma de la HSP90 en eucariotas superiores.
- **TNFα** (tumor necrosis factor alfa), factor de necrosis tumoral alfa, citoquina pro-inflamatoria.
- **Ubiquitina**, proteína de 76 aminoácidos y 8,6 kDa, cuya misión es la señalar a las proteínas que van a ser degradadas por el proteosoma.
- **Ydj**, proteína homóloga de la DnaJ, en levadura.

10. EPÍLOGO

La elección del tema «PROTEÍNAS DEL ESTRÉS Y CARABINAS MOLECULARES. PROYECCIONES CLÍNICAS Y TERAPÉUTICAS» como Discurso de Apertura Curso Académico 2002 de la Real Academia de Farmacia, tiene su base en investigaciones llevadas a cabo por mi grupo de investigación en el Departamento de Bioquímica Farmacológica y Toxicológica del Instituto de Bioquímica (Centro Mixto CSIC-UCM) en la Facultad de Farmacia de Madrid de la Universidad Complutense de Madrid.

Estas investigaciones sobre Proteínas del Estrés en modelos de hepatotoxicidad inducida por fármacos en animales de experimentación, se han realizado gracias a la financiación conseguida para los proyectos de investigación siguientes de los que soy investigadora principal:

- PM 96-0010. Administración de antioxidantes en Hepatotoxicidad Experimental. Parámetros de lesión hepática y regeneración. Expresión de proteínas de estrés.
- FIS 99/1045 Interacción de Xenobióticos. Hepatotoxicidad y envejecimiento, influencia de antioxidantes.
- SAF2000-0128 Efecto del choque térmico en la hepatotoxicidad de fármacos in vivo e in vitro.

Fruto de esta colaboración han sido, hasta la fecha, las siguientes publicaciones:

1. Proteínas del estrés y hepatotoxicidad. Carmen Díez-Fernández y María Cascales. En: Bioquímica y Fisiopatología del Estrés

- Oxidativo (ed M Cascales) pp 157-181. Fundación José Casares Gil y Real Academia de Farmacia. Madrid, 1997.
2. HSP-70 induction by CsA in cultured hepatocytes. Effect of vitamin E succinate. David Andrés, Nuria Sanz , Alberto M Alvarez, Carmen Díez-Fernández, Asunción Zaragoza y María Cascales *Journal of Hepatology* 33, 570-579, 2000 .
 3. Protective effects of heat shock against TGF- β 1-induced apoptosis in cultured hepatocytes. Carmen Díez-Fernández, David Andrés y María Cascales *Biochem Pharmacol* (en prensa).
 4. Activation of heat shock factor is accompanied by the suppression of nuclear factor kB activity in rat hepatocytes cultures treated with cyclosporine A. David Andrés, Carmen Díez-Fernández, Antonio Castrillo y María Cascales *British Journaln of Pharmacology* (en prensa).

Estos trabajos de investigación han sido realizados gracias a la eficiente colaboración de los Doctores en Farmacia Carmen Díez-Fernández, David Andrés García, Antonio Castrillo, Nuria Sanz Menéndez, Alberto Alvarez Barrientos, Asunción Zaragoza Castellano y María Luisa Cózar, y también con la importante la ayuda prestada por el personal de apoyo, del CSIC Dolores Velasco Pérez y Adoración Urrea. Mi agradecimiento y cariño muy especial a todos ellos.