



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO Y SUS APLICACIONES”

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
ALONDRA FUENTES LÓPEZ

DIRIGIDA POR:
ASESOR: MC. JOSEFINA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ
CO-ASESOR: MC. BERENICE YAHUACA JUÁREZ

MORELIA, MICH. ENERO DEL 2006





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO Y SUS APLICACIONES”

TESINA

*QUE PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO*

PRESENTA:

ALONDRA FUENTES LÓPEZ

ASESOR:

MC JOSEFINA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

CO-ASESOR:

MC BERENICE YAHUACA JUÁREZ

SINODALES:

DC CONSUELO DE JESÚS CORTÉS PENAGOS

DC CARLOS CORTÉS PENAGOS

DC HECTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES

MORELIA, MICH. ENERO DEL 2006



El presente trabajo de investigación bibliográfica se llevo a cabo en la Escuela de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en el Laboratorio de Biotecnología "M.C Victor Manuel Rodríguez Alcocer", bajo la Asesoría de la M.C Josefina Hernández Martínez y la Co-asesoría de la M.C Berenice Yahuaca Juárez.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la fuerza de continuar y permitirme llegar hasta donde estoy.

A mis Padres por siempre estar a mi lado.

A mis hermanos Joan y Jorge por siempre apoyarme.

A ti Javier Aarón por ser mi inspiración y formar parte de mi vida por ser el que me brindo su corazón sin condición alguna.

A mi Abuelita por siempre creer en mí.

A toda mi Familia.

A ti Juan Antonio por siempre confiar en mí y darme el apoyo cuando siempre lo necesite.

A la Maestra Josefina porque me abrió su corazón aún sin conocerme.

A la Maestra Berenice por ser una persona trabajadora e inteligente.

Al Dr. Héctor por depositar su confianza en mí.

Al Maestro Toñito por su amistad

A mis Sinodales la Dra. Consuelo y al Dr. Carlos.

A mis amigos que siempre estuvieron a mi lado apoyándome.

A mi amigas Moradita, Rebe y Bere por su cariño y comprensión que me demostraron en cada momento.

A mi tía Lupita por ser la persona que siempre he admirado.

A todas aquellas personas que confiaron en mi les dedico de todo corazón esta tesina

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios por el simple hecho de darme la vida y el siempre estar a mi lado y permitirme realizar mis logros, gracias Señor.

A mis padres por ser lo más hermoso que he tenido en mi vida me siento orgullosa y feliz de ser su hija, gracias a ambos por su esfuerzo de que siguiera adelante.

A mi madre por darme siempre el valor de continuar con lo que deseo y nunca desistir, gracias mami por ser mi brazo derecho.

A mi padre por depositar su confianza en mí y enseñarme a luchar por lo que se quiere y por demostrarme su cariño a cada momento.

A mis hermanos Joan y Jorge por ser mis Ángeles de toda la vida y por aceptarme con mis virtudes y defectos.

A ti Javier por compartir tantos momentos juntos gracias por formar parte de mi vida y abrirme las puertas de tu corazón.

A mi abuelita Estela por su constancia por luchar con la vida para verme realizar mis logros, gracias abue.

A ti Juan Antonio por hacerme ver las cosas de una forma diferente y agradable.

A la Maestra Josefina por guiarme en mi camino, por ser una persona bella por dentro y fuera, gracias maestra por confiar en mí.

A la Maestra Bere por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

Al Dr. Héctor por ser una persona sencilla toda mi admiración y respeto.

Al Maestro Toñito por ser una persona con ángel y por siempre tener una sonrisa agradable en cualquier momento.

Gracias a todas aquellas personas que colaboraron con la realización de mis sueños

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL_____	I
ÍNDICE DE TABLAS_____	III
ÍNDICE DE FIGURAS_____	IV
RESUMEN_____	V
Capítulo 1	
Introducción_____	1
Capítulo 2	
Historia y Definición de las Proteínas de Choque Térmico_____	3
Capítulo 3	
Clasificación y Estructura de las HSP_____	7
3.1 Las Chaperoninas del Grupo I_____	10
3.2 Estructuras de GroEL y GroES_____	12
3.3 Mecanismo funcional de GroEL_____	14
3.4 Chaperoninas del Grupo II_____	16
Capítulo 4	
Mecanismo de acción de las Proteínas de Choque Térmico_____	20
4.1 Síntesis Proteica_____	21
4.2 Proteínas de respuesta al estrés y Chaperonas moleculares_____	23
4.3 Función en condiciones de estrés_____	24
4.4 Función molecular de las Chaperoninas_____	25
Capítulo 5	
Aplicaciones Médicas de las HSP_____	27
5.1 HSP en infecciones_____	27
5.2 HSP en Bacterias_____	28

5.3 HSP en virus _____	30
5.4 El papel metabólico de las HSP _____	31
Capítulo 6	
Las HSP en frutos y cultivos hortícolas _____	32
6.1 Almacenamiento del fruto _____	34
6.2 Tratamientos Térmicos _____	38
CONCLUSIÓN _____	VI
BIBLIOGRAFÍA _____	VII
REFERENCIAS ELECTRÓNICAS _____	IX

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

1. Clasificación de las Chaperoninas moleculares, parcial y provisional.____	7
2. Clasificación de las Chaperoninas del Grupo I. _____	10
3. Clasificación de las Chaperoninas del Grupo II. _____	16
4. Susceptibilidad de frutas y hortalizas a los daños por frío cuando se almacenan a bajas temperaturas pero no de congelación. _____	35

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Papel de las chaperoninas en la célula _____	8
2. Microscopía electrónica de GroEL _____	9
3. Imágenes medias de GroEL, GroEL-ES y GroEL -ES2. _____	11
4. Estructura atómica de los monómeros de GroEL y de GroES. _____	13
5. Mecanismo de funcionamiento de GroEL. _____	14
6 .Características y propiedades de las chaperoninas de tipo I y de tipo II. _	17
7. Estructuras de CCT, CCT-ATP y CCT-actina. _____	18

RESUMEN

Cuando un organismo se encuentra en un medio ambiente que le causa un estrés sufre un daño celular por lo que necesita ser reparado. Las sustancias que se han identificado como indicadoras de esta reconstrucción celular son las proteínas del estrés descubiertas en el Choque térmico. La llamada respuesta al Choque térmico es un mecanismo adaptativo compartido por prácticamente todos los seres vivos, consiste en el aumento rápido de la síntesis de una serie de proteínas (denominadas proteínas HSP, iniciales del inglés *Heat Shock Proteins*) ante la elevación brusca de la temperatura por encima de la óptima. Ahora se sabe que las HSP se inducen ante otras agresiones o estrés ambientales como: presencia de etanol u otros solventes orgánicos en el medio, o daño al ADN. Estas proteínas se liberan hasta 2h después de la agresión al organismo. Las HSP protegen a las células del daño que les causaría una posterior elevación adicional de la temperatura. Este sistema constituye un mecanismo adaptativo de protección que, una vez que detecta incrementos de temperatura, prepara al organismo para soportar períodos relativamente largos a temperaturas por encima de la óptima de crecimiento a lo cual se denomina Termotolerancia que es la capacidad de resistencia de las células a una temperatura letal. La mayor parte de las HSP se expresan a niveles basales durante el crecimiento normal. Tras la agresión ambiental, aumentan y luego vuelven lentamente al nivel normal aun cuando la temperatura siga alta. Muchas proteínas son incapaces de alcanzar su conformación nativa por lo que las HSP son proteínas celadoras que intervienen en el plegamiento adecuado de estas proteínas. Las HSP se consideran entre las proteínas más conservadas y abundantes presentes en la naturaleza. Estas proteínas han generado un mayor interés desde que fueron descritas como antígenos dominantes de microorganismos infecciosos. El reconocimiento del sistema inmune hacia las HSP del patógeno sirve como una primera línea de defensa al tiempo que es la forma por la que se puede desencadenar un proceso autoinmune como consecuencia de la aparición de una reactividad cruzada con las HSP propias. Como una consecuencia de su función chaperona, las HSP se encuentran asociadas a un amplio espectro de péptidos derivados de las células de las que estas proteínas se aíslan. Por ello, los complejos HSP-péptidos se comportan como antígenos específicos de tumores. El tratamiento de choque térmico en los frutos como tecnología de almacenamiento logran la activación de las proteínas de choque térmico HSP17 y HSP70 para inhibir el daño por frío al exponer a productos hortofrutícolas a temperaturas bajas para retardar el proceso de maduración en el tiempo que dura el proceso de exportación. El objetivo de esta investigación es conocer la función, estructura, mecanismo y aplicación de las Proteínas del Choque Térmico.

Palabras Clave: HSP, Choque Térmico, Daño por frío.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

El establecimiento de los pliegues de una molécula de proteína en una estructura terciaria es algo complicado que se ha estudiado por muchos años. La proteína no se forma toda de una vez, en algunas células toma varios minutos desde el comienzo de la síntesis hasta que adquiere la conformación nativa. Este proceso es complejo por lo cual la célula con el fin de asegurar la producción de moléculas de buena calidad utiliza un grupo de proteínas llamadas chaperonas moleculares, que ayudan a prevenir el plegamiento inapropiado que conduce a desórdenes metabólicos. Algunas chaperonas se unen a proteínas en formación y las protege de las interacciones con otras hasta que la nueva molécula adquiere su estructura correcta. Otras, participan en la conformación de una molécula proteica específica.

Las chaperonas moleculares son conocidas como **proteínas de choque térmico** (HSP, del inglés *Heat Shock Proteins*) son la respuesta que se desencadena ante cambios bruscos de temperatura. Las HSP son un conjunto de proteínas que producen las células tanto de organismos unicelulares como pluricelulares (36), cuando se encuentran en un medio ambiente que le provoca cualquier tipo de estrés.

Este nuevo grupo de moléculas han venido adquiriendo en los últimos cinco años especial interés por las implicaciones que tienen en una gama de mecanismos biológicos como el control de la respuesta inmunitaria, la patogenicidad de varios microorganismos y las relaciones huésped-paciente en los procesos infecciosos. Su estudio está explicando importantes mecanismos metabólicos y abriendo las puertas para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento en procesos infecciosos, malignos e isquémicos.

La producción de estas proteínas, presentes en pequeñas cantidades en todas las células, se incrementan al aumentar la temperatura u otros factores ambientales, por lo cual el nombre adecuado debería ser “proteínas de respuesta al estrés” (39). No obstante, en la literatura científica predomina la denominación de proteínas del choque térmico. Si se producen con demasiada frecuencia o durante tiempo prolongado, se les conoce por causar cáncer.

Los productos hortofrutícolas como: aguacate, guayaba, calabacita, mango, jitomate, chirimoya, entre otros, sufren de daño por frío durante el almacenamiento y transporte al ser expuestos a bajas temperaturas de 0-15°C causando alteraciones fisiológicas. Una alternativa para reducir el daño por frío es la exposición de frutos y cultivos hortícolas a tratamientos térmicos. El Choque térmico en frutos tiene como consecuencia la termotolerancia. La respuesta al choque térmico se encuentra ligada a otros tipos de estrés, ya que produce protección contra deshidratación, daño por frío y congelamiento, metales pesados y estrés oxidativo en células de plantas, los frutos tratados con choque térmico no

sufren daño por frío mientras que los frutos no tratados sufren daño por frío en el 63% en comparación con los frutos tratados.

El choque térmico se da en dos fases: Inducción de las Proteínas de Choque Térmico que consiste en la exposición del fruto a tratamientos a temperaturas de 38-40°C por un tiempo de 30-240 minutos, induce la expresión de los genes hsp17 y hsp70, responsables de codificar para las HSP17 y HSP70 (48). En la segunda fase se expone el fruto a temperaturas de 50°C para reducir la carga microbiana en el fruto.

El tratamiento de choque térmico en los frutos como tecnología de almacenamiento logran la activación de las proteínas de choque térmico HSP17 y HSP70 e inhiben el daño por frío al exponer a productos hortofrutícolas a temperaturas bajas para retardar el proceso de maduración en el tiempo que dura el proceso de exportación (48).

Si estudiamos la historia del desarrollo científico encontraremos que en muchas ocasiones el hallazgo de determinada proteína o fenómeno metabólico parece abrir la puerta para aclarar múltiples fenómenos para los cuales no había una clara explicación (39). Con el correr del tiempo, el entusiasmo se sedimenta, y se encuentra que no todo era explicable por ese nuevo hallazgo, pero algo o mucho se avanza en el conocimiento. Es posible que se quieran explicar muchos fenómenos por medio de la acción de las HSP y que al final no todo resulte positivo, pero lo que sí está claro es que estamos en una nueva época del conocimiento científico en el cual estas moléculas nos mantendrán ocupados por varios años.

CAPITULO 2

HISTORIA Y DEFINICIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Muchas proteínas son incapaces por sí solas de alcanzar su conformación nativa. Las Chaperoninas son unos complejos proteicos que facilitan el plegamiento adecuado de aquéllas. "La conformación nativa de una proteína está determinada por su secuencia aminoacídica y la totalidad de sus interacciones atómicas entre estos" (56). En esta afirmación queda enunciada una de las hipótesis que más interés ha suscitado en el campo de la biología molecular en los últimos treinta años, la relativa al plegamiento de las proteínas. El principio de autoplegamiento de las proteínas descrito por el equipo de Christian Anfinsen (1), y los experimentos subsiguientes que demostraron su validez, provocaron una revolución en biología molecular y crearon el nuevo campo que ha dado en llamarse "El plegamiento de proteínas" (30).

De acuerdo con esa hipótesis, en 1953 por Christian Anfinsen propuso que la información requerida para que una cadena de aminoácidos se pliegue se encuentra en la propia secuencia (1). Desde los años veinte, el progreso de la química permitió caracterizar las proteínas como estructuras homogéneas. Además de su gran tamaño, en comparación con los lípidos o los azúcares, las proteínas presentan una notable complejidad.

En 1953 Frederick Sanger determinó la estructura primaria de la insulina (56). Posteriormente se lograron las primeras síntesis de péptidos de interés biológico, como lo son las hormonas oxitocina y vasopresina. Se realizaron también las primeras hipótesis sobre los tipos de estructuras que las proteínas pueden adoptar en solución (hélice α , lámina B y otras). Se dió un paso más y se vinculó la estructura con la función.

Anfinsen sugería en 1963 (1) que "otra molécula (por ejemplo un anticuerpo, otra proteína o incluso la misma proteína) pudiera influir en el proceso de plegamiento mediante reacciones intermoleculares". Se comprobó muy pronto que no basta el proceso de autoplegamiento para garantizar el plegamiento de las proteínas "in vivo". El plegamiento no es en muchas ocasiones espontáneo, sino que requiere de la interacción con proteínas ya existentes y de consumo de energía (ATP) (56). A esas acompañantes moleculares se les llamó "chaperonas moleculares".

El término "estrés" lo utilizó por primera vez el fisiólogo canadiense Hans Selye en 1936 (31) para referirse a la reacción de un organismo como respuesta a una situación que exige una reacción inmediata, y no a la presión o a la tensión experimentada en ese trance.

El organismo no se recupera inmediatamente una vez que ha cesado el factor que causa el estrés, con este estímulo, el organismo sufre un daño celular. Se ha identificado la producción de proteínas conocidas como *proteínas del estrés* las cuales sirven como indicadores de la reconstrucción celular, estas fueron descubiertas en el choque térmico (31).

Este nuevo grupo de proteínas conocidas inicialmente como Proteínas de Choque Térmico fueron descubiertas accidentalmente por F.M. Ritossa en 1962 (36) quien las observó en células de las glándulas salivales de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. El cromosoma presentaba engrosamientos en diferentes lugares del ADN pocos minutos después de ser sometidas a incrementos en la temperatura ambiental, (36). Estos abultamientos del ADN correspondían a la amplificación de genes que codificaban proteínas que fueron posteriormente identificadas por A. Tissières como **proteínas del choque térmico**, que tenían entre ellas distinto peso molecular, entre las que sobresalía una de 70 kDa conocida como HSP70 (39).

El término Chaperona molecular acuñado por Ronald Laskey en 1978 (56) para describir las propiedades de la nucleoplasmina, una proteína nuclear, que interviene en el ensamblaje de los nucleosomas a partir de ADN y de histonas. La nucleoplasmina, es una proteína fuertemente ácida que se une transitoriamente a las histonas, con lo que reduce su carga positiva e inhibe la tendencia de éstas a agregarse inespecíficamente con el ADN. La nucleoplasmina dotada de carga negativa, no proporciona información espacial a las histonas para que se plieguen adecuadamente, ni es un componente estructural de los nucleosomas, pero su interacción con las histonas permite que las propiedades de autoplegamiento de éstas predominen sobre la tendencia a unirse al ADN en razón de sus cargas opuestas. La acción de la nucleoplasmina es fugaz, y no genera ni rompe enlaces covalentes (56).

Las chaperonas moleculares son proteínas que se unen y estabilizan las conformaciones inestables de otras proteínas. Mediante las uniones y las liberaciones controladas, pueden facilitar la conformación nativa de las proteínas o el ensamblaje entre éstas para crear oligómeros (56). La familia de las chaperonas está formada por numerosas proteínas de distinta secuencia y diverso peso molecular, como por ejemplo, las chaperoninas que desempeñan un papel activo en el plegamiento de proteínas.

Sean Hemmingsen en 1986 (56) designó como Chaperonina a una familia de proteínas que comparten homología en su secuencia aminoacídica y actúan como chaperonas en cloroplastos, mitocondrias y bacterias. Su peso molecular está en torno a los 60 kDa.

La primera chaperonina descrita como tal (56), fue la proteína que se une a la ribulosa bifosfato carboxilasa, RBP (Rubisco binding protein). La enzima Rubisco se encarga de asimilar a partir de CO₂, el carbono en los cloroplastos.

El grupo de John Ellis (8) de la Universidad de Warwick, descubrió que la subunidad grande de la Rubisco tiende a formar agregados insolubles cuando se aísla. Además Ellis y su equipo (9) encontraron una proteína que se une a la Rubisco e impide su agregación, la RBP de 60 kDa, que no guarda ninguna homología con la nucleoplasmina; lo que hizo pensar que las dos proteínas constituían casos diferentes e ideados “ad hoc” por la naturaleza para tratar con proteínas oligoméricas (histonas y Rubisco), cuyo plegamiento podría presentar dificultades (10).

Hugh Pelham en 1986 (56) en el Laboratorio de Biología Molecular de Cambridge lanzó la hipótesis de que RBP, la nucleoplasmina y otras proteínas asociadas tanto a estados de choque térmico como de aumento de temperatura celular (HSP, Heat Shock Proteins) actuarían como chaperonas moleculares; además sugirió que el mecanismo de plegamiento podría ser un fenómeno común en la naturaleza. Dicha hipótesis fue corroborada por las técnicas de comparación de secuencias (56).

La proteína ribulosa bifosfato carboxilasa (RBP) presenta una homología del 50% con la secuencia de GroEL (56), la cual es una proteína de *E.coli* indispensable en la morfogénesis de ciertos bacteriófagos. El descubrimiento de la homología entre RBP y GroEL provocó otros muchos ensayos parecidos a los que Anfinsen (1) realizó tres décadas antes, tales como, la renaturalización de proteínas en presencia de GroEL después de haber sido desnaturalizadas con urea.

Este tipo de experimentos mostró que para un gran número de proteínas, la presencia de GroEL, por lo menos acelera su proceso de plegamiento o en el caso extremo resulta imprescindible para el plegamiento de la proteína (56).

Al mismo tiempo que se descubría la homología entre Rubisco y GroEL, se observó que los anticuerpos generados contra GroEL reaccionan también contra una serie de proteínas de choque térmico y de peso molecular cercano a las 60 kDa que se encuentran tanto en mitocondrias de plantas, como en levaduras y células animales (56). Estas proteínas también intervienen en el plegamiento de proteínas importadas del citosol y presentan una estrecha homología de secuencia con RBP y GroEL.

Las chaperoninas ayudan al plegamiento de proteínas tanto en situaciones normales como en condiciones de estrés (56). Ese fenómeno contrasta con la tendencia observada en otras proteínas celulares para desnaturalizarse. De este modo adquirió un significado más amplio la función de las acompañantes moleculares.

No todas las proteínas de estrés térmico son chaperoninas ni todas las chaperoninas son proteínas de estrés térmico; así, mientras GroEL ve aumentada su expresión cuando *E.coli* sufre un choque térmico, las chaperoninas cloroplásticas no se activan con el calor.

Las HSP son un conjunto de proteínas que producen las células tanto de organismos unicelulares como pluricelulares (36), cuando se encuentran en un medio ambiente que le provoca cualquier tipo de estrés.

Debido a que las HSP aumentan en cualquier situación estresante para un organismo, es decir, en cualquier condición que supera las fluctuaciones normales de las funciones del organismo (homeostasis), el nombre adecuado debería ser el de **proteínas de respuesta al estrés** (57). Sin embargo, en la literatura científica predomina la denominación de proteínas del choque térmico (36). Estas proteínas no se liberan en grandes cantidades y es hasta que han pasado por lo menos dos horas después de la agresión al organismo (31). Las HSP son unas proteínas que se encuentran muy conservadas en la historia evolutiva de todos los seres vivos, puesto que aparecen con función y estructura muy similar en *archaea*, bacterias, levaduras, plantas y animales (36).

La producción o expresión de las HSP (39), está presente en pequeñas cantidades en todas las células libres de estrés, aunque no se conoce su función biológica en el estado normal el aumento de su producción puede deberse a diversos factores de estrés (51) como:

- Aumento de temperatura: Un incremento de 5 grados de la temperatura normal de la célula, desencadena una rápida síntesis de proteínas de choque térmico, llegando a ser en corto tiempo entre el 15 y el 25% del total de las proteínas celulares.
- Disminución de temperatura.
- Cambios en la presión osmótica.
- Presencia de sustancias tóxicas tales como toxinas; estas utilizadas en quimioterapia, drogas, alcohol, etc.
- Ambiente con pH extremos.
- Presencia de metales pesados.
- Traumatismos.
- Isquemia.
- Radiaciones ionizantes.

Las HSP regulan procesos celulares que van desde el plegamiento de proteínas hasta la prevención de la muerte celular programada (53). Los datos han puesto de manifiesto que el choque térmico no es mas que un tipo de estrés entre otros muchos que hacen que las HSP se sobreexpresen en la célula. El incremento en la producción de HSP constituye un mecanismo de defensa celular propio de todo organismo unicelular o pluricelular (36). Por ejemplo, las bacterias que presentan mutaciones en los genes que las codifican presentarán defecto en el ADN y por ende en la síntesis del RNA, tendrán dificultades para completar el ciclo normal de reproducción o serán incapaces de degradar adecuadamente las proteínas (57). Por otra parte, mueren más fácilmente con los cambios de temperatura o el efecto de cualquier factor ambiental estresante, por su imposibilidad de producir estas proteínas.

CAPITULO 3

CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LAS HSP

En muchas ocasiones, las proteínas requieren la ayuda de otras proteínas que se han denominado chaperonas o acompañantes moleculares (36). El número de proteínas que se incluye dentro de la familia de las chaperonas es enorme y aumenta día a día como se muestra en la Tabla 1. Las HSP se han clasificado en cuatro familias denominadas: HSP90, HSP70, HSP60 y HSPs de acuerdo a su estructura, secuencia de aminoácidos, peso molecular y su grado de homología (51).

Las chaperonas moleculares son un amplio grupo de proteínas involucrado en procesos de asistencia en el plegamiento de otras proteínas. Incluida en las chaperonas moleculares hay una familia, la de las chaperoninas o chaperonas moleculares, de peso molecular cercano a 60 kDa (hsp60), que son quizás las mejor caracterizadas (30). Se conocen dos tipos de chaperoninas, el Grupo I de origen procariota y pertenecientes a organelos citoplasmáticos y el grupo II provenientes de arqueobacterias y presentes en el citosol de eucariotas.

Tabla No.1 Clasificación de la Chaperoninas moleculares, parcial y provisional.

Diferentes sistemas de chaperonas moleculares					
	Bacterias			Levaduras	
Sistema	Nombre	Función	Nombre	Función	Comportamiento
100	ClpA	Tolerancia frente a estrés térmico	Hsp 104	Tolerancia frente a estrés térmico	Citosol
90	HtpG	Se une a proteínas desnaturalizadas	Hsp90	Se une a proteínas desnaturalizadas, las pliega o las lleva a su compartimiento	Citosol
70	DnaK	Se une a proteínas recién sintetizadas	SSA1-4	Se unen a proteínas recién sintetizadas	Citosol
			SSB1, 2	Se unen a polisomas	
			SSC1	Se une a proteínas importadas	Mitocondria
60	GroEL	Se une a intermediarios de plegamiento. Asiste en el plegamiento	Hsp60	Se une a proteínas importadas. Asiste en el plegamiento	Mitocondria
			CCT	Asiste en el plegamiento de actina y tubulina	Citosol
40	DnaJ	Se une a proteínas desnaturalizadas. Interacciona con DnaK	MDE1	Interacciona con Hsp70 SSC1	Mitocondria
20-25	GrpE	Interacciona con DnaK	MGE1		
10	GroES	Asiste a GroEL en su actividad plegadora	Hsp10	Asiste a Hsp60 en su actividad plegadora	Mitocondria

Muchas de estas proteínas, **aunque no todas**, son proteínas de choque térmico. Cumplen funciones muy dispares. Ambos tipos de chaperoninas comparten una arquitectura muy parecida pero poseen importantes diferencias en el mecanismo de funcionamiento (39), en los cambios estructurales que se producen durante aquél y en las proteínas a las que asisten en su plegamiento.

Anfinsen y colaboradores (30) demostraron que la información necesaria para que una proteína alcance su conformación nativa se encuentra en su propia secuencia. Ahora se conoce que las proteínas no pueden alcanzar su conformación funcional por sí mismas debido a una serie de factores (Figura 1). Un factor importante es la alta concentración de macromoléculas existente en la célula (200-400 mg/ml), alejada de las condiciones usadas in vitro, y que produce interacciones no deseadas entre las proteínas que están siendo sintetizadas. Otro problema que se enfrenta la célula son situaciones de estrés ya sea térmico, salino etc., que produce la desnaturalización de ciertas proteínas sensibles a estos estados. Finalmente, las proteínas sintetizadas deben de conservar una conformación desplegada para poder atravesar las membranas de ciertos organelos en los que van a actuar.

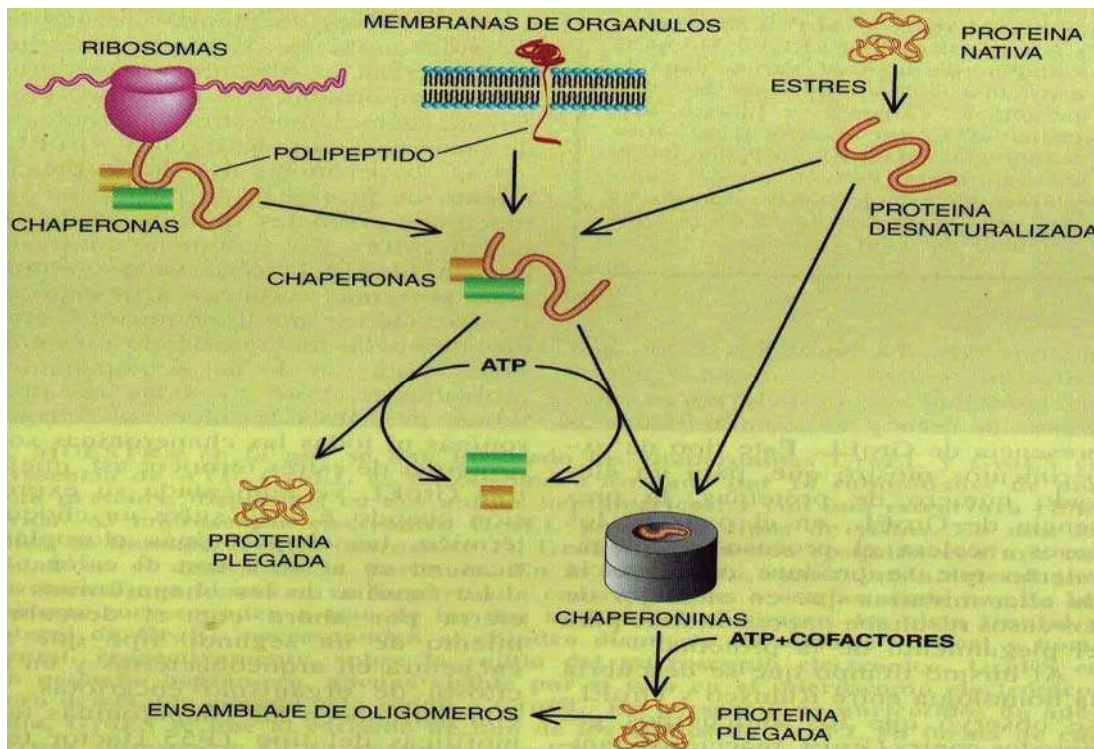


Figura 1. Papel de las chaperoninas en la célula. El papel de las chaperoninas en el plegamiento de proteínas es múltiple. Chaperonas de diversos tipos se unen a los polipéptidos recién sintetizados en los ribosomas (arriba a la izquierda), a proteínas que atraviesan las membranas de diversos organelos (arriba en el centro) o a proteínas que se han desnaturalizado debido a cualquier tipo de estrés (arriba a la derecha). Esta unión tiene en un número elevado de casos un papel de protección para evitar que las proteínas alcancen un estado de agregación irreversible. Las chaperonas en general pueden tener un papel activo en el plegamiento de las proteínas, aunque en la mayor parte de los casos parecen transportar los polipéptidos desnaturalizados hasta las chaperoninas, donde son plegados (56).

Todas las chaperoninas conocidas hasta la fecha son oligoméricas y comparten una estructura similar: un cilindro compuesto por uno o dos anillos dispuestos espalda contra espalda (Figura 2).

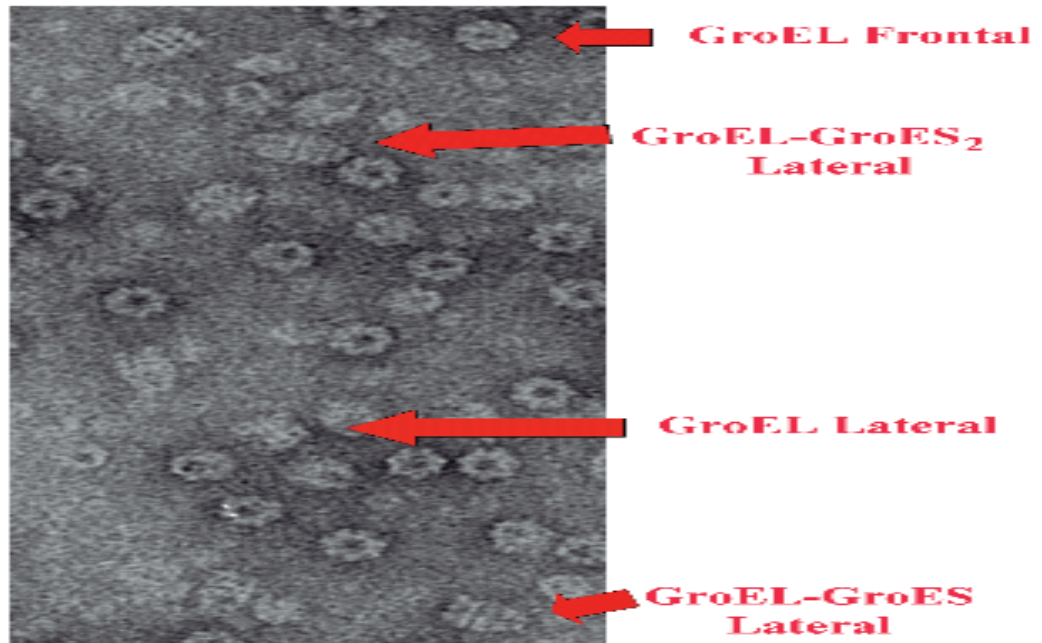


Figura 2. Microscopía electrónica de GroEL. Imagen tomada de un campo de microscopía electrónica de una muestra en la que se ha incubado las chaperoninas GroEL y GroES en presencia de ATP. GroEL es un oligómero formado por 14 subunidades de una sola proteína, dispuestas en dos anillos heptaméricos y con una estructura cilíndrica. En el microscopio electrónico GroEL muestra dos tipos de vistas. En una de ellas, la llamada frontal, GroEL tiene la forma de una rosquilla con una cavidad en el centro de la partícula. En la otra vista, denominada lateral, se observa en la partícula cuatro bandas o estrias, de las cuales cada dos corresponde a uno de los dos anillos del oligómero. La vista frontal y lateral de GroEL corresponde al cilindro dispuesto de manera vertical y horizontal, respectivamente, sobre la rejilla del microscopio electrónico. GroES es un pequeño heptámero, apenas visible por sí solo en el microscopio electrónico, pero detectable cuando está unido a GroEL. En presencia de nucleótidos de adenina, GroES se une al extremo de uno de los anillos de GroEL en forma de caperuza, tapando de esta manera la cavidad que cada anillo posee. Este complejo GroEL-GroES se denomina asimétrico y tiene la forma de una bala. En condiciones fisiológicas y en presencia de ATP, un oligómero de GroES se une a cada uno de los anillos de GroEL, y da lugar a lo que se ha denominado un complejo GroEL-GroES simétrico, que tiene forma de balón de rugby. Tanto los complejos asimétricos como los simétricos forman parte del ciclo de plegamiento de GroEL (30).

Cada anillo encierra una cavidad, que es el lugar donde se produce el plegamiento de las proteínas (44). Esta arquitectura es común a todas las chaperoninas, que sólo difieren entre sí en el número de subunidades, iguales o diferentes, de las que se compone cada anillo.

3.1 Las Chaperoninas de Grupo I

Las chaperoninas del Grupo I son las más conocidas y estudiadas hasta la fecha, las cuales se encuentran en eubacterias y organelos de organismos eucarióticos como las mitocondrias y cloroplastos como se muestra en la Tabla 2.

Tabla No.2 Clasificación de las Chaperoninas del Grupo I (56).

Clasificación de las chaperoninas								
Chaperonina	Organismo	Localización	Sustrato conocido	Homología con respecto a:		Nº de subunidades en cada anillo	Nº de subunidades diferentes	Cochaperonina
				GroEL	TF55			
Grupo I								
GroEL	Eubacterias	Plasma	40% proteínas sintetizadas	---	Débil	7	1	GroES
mt-cpn60	Eucariotas	Mitocondria	Proteínas mitocondriales importadas	50%	Débil	7	1	mt-cpn10
RBP	Plantas	Cloroplasto	Subunidades de la rubisco	50%	Débil	7	2	ch-cpn10

Todas las chaperoninas de este grupo tienen una estructura muy parecida, un cilindro constituido por uno o dos anillos heptaméricos (30) (Figura 3). Las chaperoninas de eubacterias y de organelos eucarióticos dibujan tetradecámeros compuestos por una o dos subunidades distintas, mientras que las chaperoninas de arqueobacterias y del citosol eucariota forman hexadecámeros u octadecámeros que constan de una hasta ocho subunidades distintas (56).

La proteína más estudiada dentro de esta familia es GroEL de *Escherichia coli*. GroEL es una proteína esencial para la viabilidad de la bacteria, experimentos bioquímicos han mostrado que al menos el 10 % de las proteínas celulares interactúan con esta chaperonina (30). GroEL es abundante en todas las etapas de la vida de *E.coli* y en la mayoría de las bacterias (44).

GroEL y demás chaperoninas de este grupo actúan en coordinación con una chaperonina de bajo peso molecular en torno a los 10 kDa a la que se unen en presencia de ATP para formar un complejo estable. Estas proteínas se llaman cochaperoninas, denominándose GroES a la cochaperonina de GroEL (56).

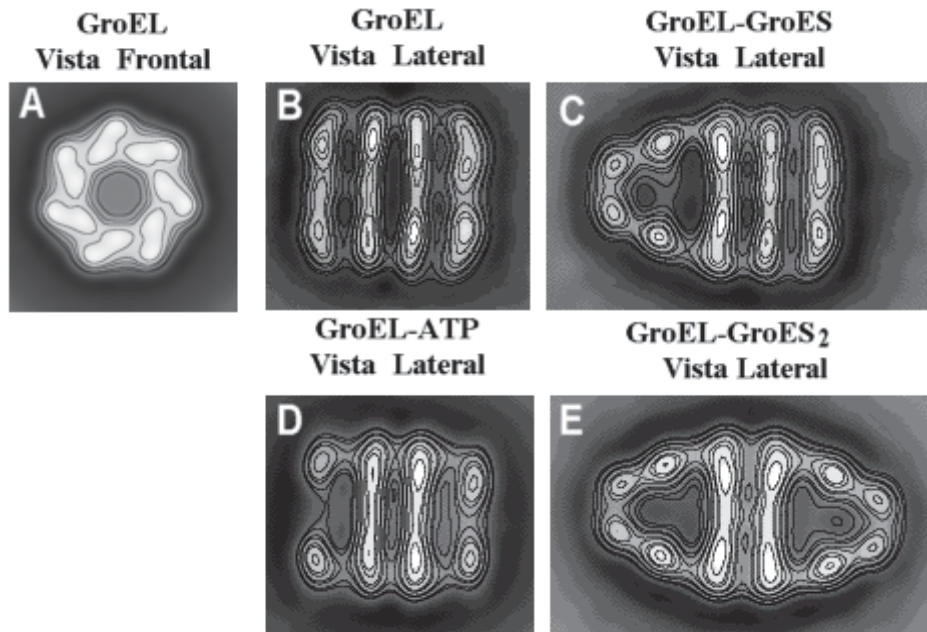


Figura 3. Imágenes medias de GroEL, GroEL-ES y GroEL -ES₂. Del promediado de cientos de partículas como las mostradas en la Figura 2 se puede obtener imágenes medias de las distintas conformaciones de GroEL que se pueden obtener durante su ciclo funcional. La adición de ATP induce un cambio conformacional en los dominios apicales de GroEL que se pueden observar en la figura D (apertura de la cavidad), especialmente cuando se la compara con la misma molécula en ausencia de nucleótido (Figura B). La unión de ATP a uno o a los dos anillos permite la unión de GroES a éstos, formando los complejos asimétricos (Figura C) o simétricos (Figura E) que se observan en la Figura 2. (30)

GroEL se identificó genéticamente cuando se observó que es indispensable para la morfogénesis de bacteriófagos como λ , concretamente para la formación de una subestructura viral, el conector, que une la cabeza con la cola del fago (30). Sin embargo, durante varios años se estudió la interacción de GroEL con el mecanismo de morfogénesis viral y no su función propia en la bacteria. Cuando se descubrió su homología con otras proteínas de similar peso molecular e involucradas en mecanismos de defensa relacionados con el choque térmico, (Hsp60, proteínas de choque térmico de 60 kDa), GroEL comenzó a ser utilizada por un gran número de laboratorios para caracterizar los mecanismos de asistencia en el plegamiento de proteínas (30). Los experimentos que se realizaron para probar su función son ahora clásicos. A la manera de los ensayos de Anfinsen, las proteínas a renaturalizar son desnaturalizadas con agentes caotrópicos e incubadas posteriormente en un amortiguador que incluye GroEL y que además sirve para diluir el agente desnaturalizante (30).

Una vez realizada la incubación con la chaperonina, se ensaya la actividad funcional de la proteína para comprobar el grado de renaturalización alcanzada. Este grupo de ensayo mostró que un gran número de proteínas, de las cuales no todas pertenecen a *E.coli* son capaces de ser replegadas por GroEL (30).

En la mayor parte de los casos se requiere el concurso de dos cofactores: El primero es un pequeño oligómero formado por siete subunidades de una proteína llamada GroES, que se une a la boca del anillo de GroEL ya que ambas estructuras son heptaméricas que se ajustan para bloquear la cavidad formada por el anillo de GroEL (30). El segundo de los cofactores es ATP, y su unión con la subsecuente hidrólisis mantendrá activo el ciclo funcional de la chaperonina (56).

3.2 Estructuras de GroEL y GroES

Las principales funciones de las chaperoninas son: impedir la agregación de los polipéptidos parcialmente plegados y liberados de los ribosomas, unirse a péptidos parcialmente plegados aunque atrapados en una conformación tal que no pueden plegarse de manera espontánea (57) y finalmente proteger a las proteínas de la desnaturalización debida a estrés térmico o facilitar el plegamiento si se ha producido la desnaturalización (56). Las chaperoninas generan las condiciones adecuadas para un plegamiento correcto de las proteínas desnaturalizadas.

De los numerosos estudios realizados por difracción de Rayos X y microscopía electrónica, se tiene una clara idea de la estructura de GroEL y su cochaperonina GroES, de cómo interaccionan, y de los cambios más drásticos que se producen durante su interacción y durante el ciclo de funcionamiento de GroEL (30). El monómero de GroEL tiene tres dominios bien definidos (Figura 4):

- Un dominio ecuatorial, que posee la mayor parte de los aminoácidos responsables de las interacciones (44) con las subunidades del mismo anillo heptamérico y todos los responsables de la interacción con las subunidades del otro anillo (56); este dominio también acoge al sitio de unión de ATP, que es el corazón de la maquinaria de GroEL (30).
- El segundo dominio es el apical (44), que se encuentra a la entrada de la cavidad de cada anillo y que posee una agrupación de residuos hidrófobos involucrados en el reconocimiento de los péptidos desnaturalizados que se encuentren en su entorno (56). Los mismos residuos están involucrados en la unión con la chaperonina GroES, y este hecho es importante en el mecanismo de funcionamiento de GroEL.
- Finalmente, existe un tercer dominio, el intermedio, que ejerce de transmisor de las señales (44) que se producen entre los dominios ecuatorial y apical y funciona como una bisagra para trasladar los grandes cambios conformacionales que, producto de la unión de ATP y GroES, ocurren en el dominio apical (30).

La estructura de GroES es mucho menos compleja (Figura 4). Cada monómero de esta cochaperonina tiene una estructura de barril de láminas β . La mayor parte del monómero está estructurado excepto un gran lazo que se encuentra desordenado, pero que cuando interacciona con el dominio apical de

GroEL, se une fuertemente a éste y genera en él un gran cambio conformacional (30). El heptámero de GroES, dependiendo del momento del ciclo funcional de GroEL en que se encuentre, puede unirse a uno de los anillos de GroEL o a los dos, formando lo que se ha denominado respectivamente, complejos asimétricos o simétricos de GroEL y GroES (Figura 3).

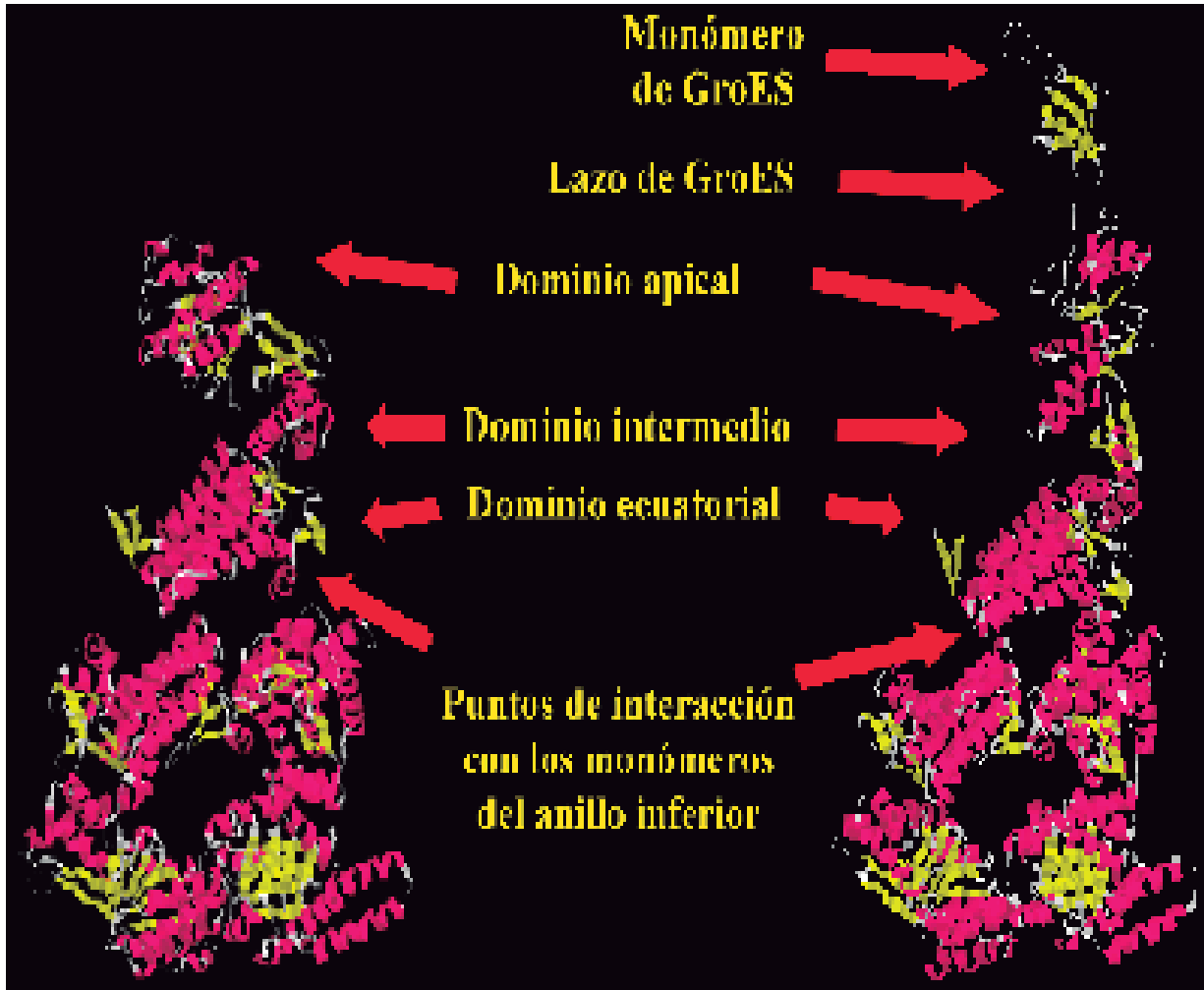


Figura 4. Estructura atómica de los monómeros de GroEL y de GroES. En ambas imágenes se observa la estructura atómica de un monómero de GroEL correspondiente al anillo superior de GroEL, enfrentado a los dos monómeros del anillo inferior con los que interacciona. En la imagen de la izquierda se representa la conformación abierta y susceptible de aceptar polipéptidos desnaturalizados, en la que el dominio apical del monómero superior se encuentra en la posición basal. La unión de ATP en el sitio de unión de este nucleótido (situado en el dominio ecuatorial) y la posterior unión de la cochaperonina GroES (de la que sólo se muestra un monómero en la imagen de la derecha) transmite al dominio apical a través del dominio intermedio una señal para que en aquél se genere un gran cambio conformacional de tal manera que ahora se eleva y apunta hacia arriba, lo que produce un considerable aumento de la cavidad de GroEL. (30).

3.3 Mecanismo funcional de GroEL

Durante los últimos años se han realizado multitud de experimentos de carácter bioquímico y biofísico que han permitido tener una idea bastante clara de cuál es el mecanismo de funcionamiento de GroEL y por ende, de todas las chaperoninas del grupo I (Figura 5):

1) Los residuos hidrofóbicos que forman un anillo alrededor de la boca de la cavidad de cada anillo funcionan como un imán que reconoce y une todos los residuos hidrofóbicos que se encuentran a su alrededor (36). Si se tiene en cuenta que las proteínas celulares que se encuentran en solución mantienen los residuos hidrofóbicos en el interior de su estructura, la exposición de éstos significa que esas proteínas no se encuentran plegadas correctamente (30). El mecanismo de reconocimiento utilizado por GroEL es por lo tanto simple e inespecífico. De ahí, el amplio rango de proteínas a las que asiste en su plegamiento.

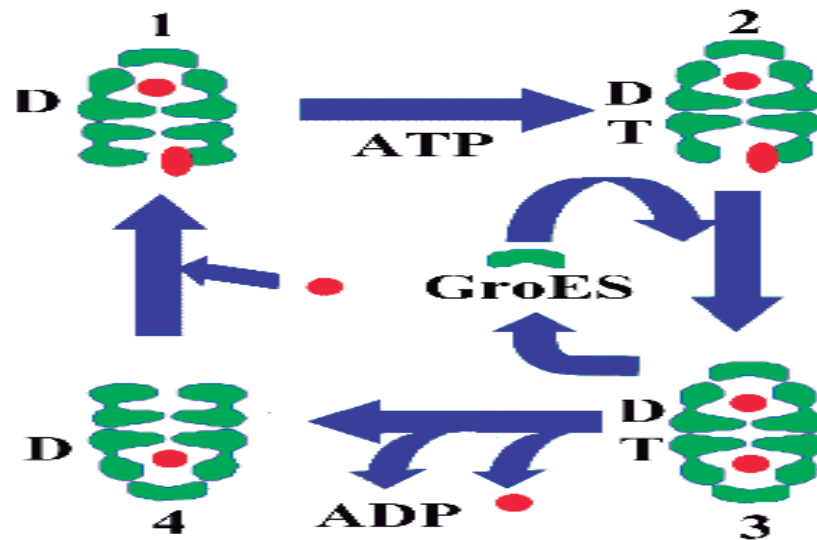


Figura 5. Mecanismo de funcionamiento de GroEL. En el esquema se observa el ciclo alternado que poseen los dos anillos de GroEL. Así, mientras que el anillo superior ya posee en su cavidad una molécula de polipéptido dispuesta a plegarse por sí mismo, el anillo inferior ha reconocido y unido otro polipéptido desplegado (posición 1). La unión de ATP a este anillo (posición 2) permite el cambio conformacional de los dominios apicales que dará lugar a la unión de GroES (posición 3) y a la señal de liberación de GroES del anillo superior, con la consiguiente liberación del polipéptido ocluido en este anillo (posición 4). El anillo superior, en este punto, se encuentra en la misma conformación que el anillo inferior en la posición 1. (30)

2) ATP se une a su sitio de unión, en el dominio ecuatorial del monómero de GroEL. La unión de ATP desencadena una serie de señales en varias direcciones:

Existe una cooperatividad positiva entre los monómeros de un mismo anillo, de manera que el resto de los monómeros de ese anillo unen ATP inmediatamente.

Se produce una cooperatividad negativa entre las subunidades de los dos anillos, de manera que una vez que una molécula de ATP se une a un monómero de los anillos y desencadena la unión inmediata de moléculas de ATP a las otras seis subunidades del mismo anillo, se impide la unión de ATP a las siete subunidades del otro anillo (30).

Se envía una señal desde el dominio ecuatorial de cada subunidad que ha unido ATP, a través del dominio intermedio hasta el dominio apical, en el que se produce un cambio conformacional (elevación de la punta del dominio apical) que permite la unión de la cochaperonina GroES (30).

3) La unión del oligómero de GroES induce un levantamiento aún mayor de las puntas de los dominios apicales de GroEL y por lo tanto un aumento de la cavidad dentro del anillo. Esta unión genera la formación del complejo asimétrico descrito en la Figura 3. Por otra parte, la unión de GroES sella la cavidad y es en ésta donde se va a producir el fenómeno más importante de todo el ciclo. Los residuos hidrofóbicos que interaccionaban con el polipéptido desnaturalizado lo hacen ahora con el lazo desordenado de GroES. El cambio conformacional promovido por la unión a la cochaperonina hace que todos los residuos hidrofóbicos y cargados que se exponían en la superficie interior de la cavidad desaparezcan y dejen paso a residuos hidrofílicos (56).

El resultado de todo ello es que el polipéptido, que había sido atrapado anteriormente por la boca del anillo, es encerrado en éste y su salida de la cavidad es imposibilitada por la cochaperonina que tapa la boca de ésta. En este estado, y libre de las interacciones no deseadas que le acechan en el exterior, (interacciones con los residuos hidrofóbicos de otras proteínas que dan lugar a agregados irreversibles), y en una cavidad que se ha hecho más grande por efecto de los cambios conformacionales que han sufrido los dominios apicales, puede el polipéptido intentar plegarse por sí mismo utilizando la información codificada en su secuencia primaria (30).

Algunos experimentos sugieren que durante el cambio conformacional inducido por la unión de ATP y GroES, los dominios apicales tiran del sustrato de manera que lo despliegan antes de liberarlo en la cavidad.

4) Las moléculas de ATP unidas en todas las subunidades del anillo se hidrolizan. (30). La hidrólisis del nucleótido, además de relajar la unión de GroES a GroEL en ese anillo, envía una señal al otro anillo para indicarle que ya puede unir ATP. Esta unión se produce, con los consiguientes cambios indicados en el punto 2. La unión de ATP permite también que otra molécula de GroES se una a este segundo anillo, formando un complejo simétrico, con una cochaperonina unida a cada anillo de GroEL, tal y como se describe en la Figura 3.

5) La formación del complejo simétrico no es estable, porque la unión de GroES al segundo anillo induce la liberación de la cochaperonina del primer anillo y la salida al exterior del polipéptido encerrado en aquel. El primer anillo está dispuesto para

recibir otro polipéptido desnaturalizado que se encuentre en su entorno (30). Los pasos 4) y 5) se reproducen ahora en el segundo anillo.

Se puede imaginar al oligómero de GroEL como un motor de dos cilindros (los dos anillos), en el que cada uno de ellos se encuentra en cada momento en posiciones diferentes del ciclo. Mientras un anillo está liberando la cochaperonina y por ende el polipéptido encerrado, el otro está uniendo otra cochaperonina. Los dos anillos funcionan de manera alternada, ya que cada uno de ellos controla al otro mediante la transmisión de señales ya mencionada, señales que van desde los dominios ecuatoriales de las subunidades de un anillo al del otro, y viceversa (30). La unión y posterior hidrólisis del ATP funciona como el combustible de los cilindros, lo que permite que el ciclo se mantenga funcionando indefinidamente.

3.4 Chaperoninas del Grupo II

El otro tipo de chaperoninas, aquéllas que se encuentran en arqueobacterias y en el citoplasma de organismos eucarióticos, es menos conocido, y sólo en los últimos años se han comenzado a realizar caracterizaciones bioquímicas y estructurales de éstas (30).

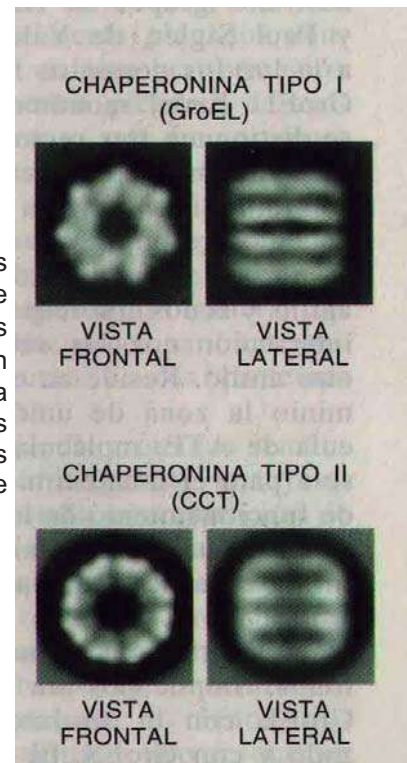
A este grupo pertenecen las chaperoninas termofilicas del tipo TF55 (factor termofílico 55, en referencia a su peso molecular), la eucariótica CCT (chaperonina que contiene el polipéptido TCP-1) como se muestra en la Tabla 3 (56).

Tabla No.3 Clasificación de las Chaperoninas del Grupo II. (56)

Clasificación de las chaperoninas								
Chaperonina	Organismo	Localización	Sustrato conocido	Homología con respecto a:		Nº de subunidades en cada anillo	Nº de subunidades diferentes	Cochaperonina
				GroEL	TF55			
Grupo I I								
TF55	Arqueobacterias	Plasma	La mayor parte de las proteínas celulares	Débil	---	9	2	No
Termosoma	Arqueobacterias	Plasma	La mayor parte de las proteínas celulares	Débil	60%	8	2	No
CCT	Eucariotas	Citosol	Actina, Tubulina	Débil	40%	8	8-9	?

La proteína TF55 de origen termófilo guarda bastante homología con TCP-1, proteína de función hasta entonces desconocida (56). Más tarde se conocería que la chaperonina CCT interviene en el plegamiento de la actina y la tubulina. Las chaperoninas extremófilas parecen ejercer una función más inespecífica en el plegamiento de proteínas.

Figura No.6 Características y propiedades de las chaperoninas de tipo I y de tipo II. Las chaperoninas de tipo I son de origen procariota y simbiote, como lo son las mitocondrias y cloroplastos; las de tipo II de origen eucariota o procedente de arqueobacterias. En presencia de sustrato, éste se introduce en la cavidad de las chaperoninas. A la derecha se pueden observar imágenes promedio de vistas frontales y laterales de los dos tipos de chaperoninas (56).



A diferencia de las chaperoninas del grupo I, las de grupo II son variables en su grado de oligomerización y en el número de subunidades que componen el oligómero. Así, la estructura de doble anillo puede ser constituida por dos anillos octaméricos ó nonaméricos, y los anillos formados por uno, dos, tres o incluso ocho proteínas diferentes (30).

Este último caso es el de la chaperonina citoplasmática de eucariotas ó CCT, que es quizás la chaperonina más interesante por lo siguiente: además de poseer ocho subunidades diferentes (aunque homólogas entre sí) en cada uno de los dos anillos octaméricos, asiste específicamente al plegamiento de actinas y tubulinas, dos proteínas citoesqueléticas de vital importancia para la célula (56).

Los estudios estructurales realizados con CCT y alguna chaperonina de arqueobacterias muestran que éstas poseen los mismos dominios (ecuatorial, intermedio y apical) que GroEL, así como sus dos conformaciones básicas (Figura 6).

Se ha caracterizado una conformación abierta, que se produce en ausencia de ATP, y en la que la cavidad se ofrece accesible para la interacción con el sustrato. La unión de ATP genera la conformación cerrada, pero a diferencia de GroEL, el cierre de la cavidad no se produce por la unión de una cochaperonina, ya que las chaperoninas del grupo II no poseen cochaperoninas, sino que un dominio extra que se encuentra en los dominios apicales cierra la cavidad al producirse el cambio conformacional. El sustrato que se ha unido previamente a la chaperonina queda así, cerrado en su cavidad (30).

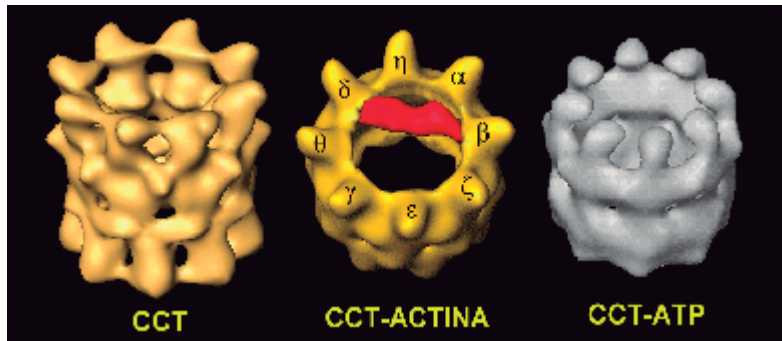


Figura 7. Estructuras de CCT, CCT-ATP y CCT-actina. . Las estructuras tridimensionales de los distintos conformeros de la chaperonina CCT que se muestran aquí se han obtenido mediante microscopía electrónica y procesamiento de imagen, y revelan la típica estructura de dos anillos común a todas las chaperoninas, con la particularidad que en este caso el oligómero está constituido por dos octámeros generados por ocho distintas subunidades (imagen izquierda). La adición de ATP (imagen derecha) genera un cambio en los dominios apicales de tal manera que éstos apuntan hacia el interior y cierran la cavidad (aunque la baja resolución de la reconstrucción no permite visualizar el cierre completo de aquélla) imitando al conformero de GroEL en el que se encuentra unida la cochaperonina GroES. La adición a la estructura libre de actina desnaturalizada permite la unión de ésta de dos maneras específicas: en uno de ellos un brazo de actina (coloreada en rojo) se une al dominio apical de la subunidad y otro al de la (imagen central), y en otro caso un brazo de actina se une a la subunidad y otro a la no representado aquí. (30)

¿Qué tipo de interacción se produce entre la chaperonina y el sustrato? Muy poco se conoce respecto a los sustratos de las chaperoninas de arqueobacterias, y la información que se ha obtenido hasta la fecha proviene de estudios realizados con CCT. La interacción entre CCT y el sustrato parece ser de distinta naturaleza a la que se establece entre GroEL y las proteínas a las que asiste en su plegamiento. Mientras GroEL reconoce residuos hidrofóbicos que se encuentran expuestos al azar en el solvente, actina se une a CCT a través de interacciones entre residuos específicos de CCT y actina (30).

Estas interacciones se producen con subunidades concretas de CCT (Figura 7), mientras que en el caso de GroEL, los polipéptidos que se unen a esta chaperonina lo hacen al azar con cualquiera de las siete subunidades. Otra de las diferencias importantes es que los sustratos con los que GroEL interacciona están parcial o totalmente desnaturalizados, mientras que parece que actina se une a CCT en una conformación casi nativa a la que sólo le falta un pequeño pero importante paso para alcanzar la conformación nativa (30).

Ese paso sólo se lo puede proveer CCT, de tal manera que ciertas mutaciones en esta chaperonina o su ausencia provocan la muerte celular. La especificidad de CCT sobre sus sustratos (actina y tubulina principalmente) y la de éstos por CCT se refuerza por el hecho de que GroEL interacciona con cualquier proteína, incluso actina y tubulina en un estado desnaturalizado, pero no es capaz de plegarlas (56).

Todo parece indicar que CCT apareció en la naturaleza a la vez que los organismos eucariotes ya que está presente sólo en ellos como la evolución de una chaperonina primigenia pudo haber sido en respuesta a los problemas de plegamiento que plantea la tubulina, proteína que apareció en los organismos eucariotes como una evolución de la proteína más primitiva FtsZ, presente en procariotas. La tubulina es una proteína muy compleja, que forma estructuras enormes llamadas microtúbulos como consecuencia de complejos fenómenos de polimerización. La formación de los microtúbulos tiene que ver con peculiaridades en la estructura de tubulina, y es posible que la aparición de aquéllas haya dado lugar a la evolución de una chaperonina específica para resolver un problema muy puntual, pero vital a la célula, como lo es el plegamiento de la tubulina y el de la actina. El hecho de que FtsZ no interaccione con CCT y su plegamiento se produzca por si sola o con la ayuda de GroEL parece apoyar esta la hipótesis (30).

CAPITULO 4

MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Las proteínas son macromoléculas que están compuestas por la unión de cientos de aminoácidos en cadenas que se pliegan para adquirir una conformación nativa (36). Hasta el momento se cree que la estructura primaria de una proteína induce a establecer las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria ya que el ADN no sólo determinará la estructura primaria sino también los niveles superiores de estructura (58). Sin embargo, la actividad biológica de la proteína depende en gran medida de su conformación nativa, de tal manera que cuando una proteína se somete a situaciones de estrés como: calor, determinadas sustancias químicas, cambios bruscos de pH, etc..., se produce una desnaturalización en dicha conformación alterándose o desorganizándose. Las cadenas peptídicas se despliegan exponiendo los aminoácidos hidrofóbicos al agua adquiriendo una conformación al azar que induce a la pérdida de su actividad biológica, especialmente cuando actúa como enzima (58).

En la desnaturalización producida por temperaturas elevadas, se rompen fácilmente los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas a causa del aumento en la energía cinética de las moléculas. La alteración del pH puede cambiar el patrón de ionización de los grupos carboxilo y amino en las cadenas laterales de los aminoácidos, desorganizando el patrón de atracciones y repulsiones iónicas que contribuyen a la estructura terciaria normal (58), perdiéndose la conformación nativa y por lo tanto su actividad biológica.

La desnaturalización puede ser irreversible, particularmente si muchas proteínas desnaturalizadas interactúan en eventos no específicos al azar, como se presenta en los cuerpos de inclusión característicos de algunas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, en algunos casos la desnaturalización es reversible, y una vez que las condiciones del ambiente vuelven a su estado normal, la proteína puede adquirir su conformación nativa en este caso se habla de renaturalización (58). Las proteínas desnaturalizadas se agregan al atraerse entre sí por sus aminoácidos hidrofóbicos (36).

La proteína no se forma toda de una vez, en algunas células puede tomar varios minutos desde el comienzo de la síntesis hasta que adquiere la conformación definitiva. Este proceso es de gran complejidad, sobretodo cuando la proteína es muy grande; por lo cual la célula con el fin de asegurar la producción de moléculas de buena calidad utiliza un grupo especial de otras proteínas, llamadas HSP (39).

Las HSP ayudan a la célula a conservar o degradar las proteínas desnaturalizadas, uniéndose a ellas para evitar que se agreguen, marcándolas para luego destruirlas, o manteniendo las cadenas de polipéptidos desplegadas en un *estado competente*, para que una vez que el estrés haya cedido, puedan volver

al plegamiento inicial, recuperando su conformación nativa y por lo tanto recuperando su función (36).

Aunque en el estado competente la proteína no puede realizar su función por no estar plegada en su estructura nativa, los aminoácidos que componen la proteína siguen unidos en su estructura primaria, dispuestos para adquirir la conformación tridimensional correspondiente (36).

Un aspecto importante de las HSP es que son la respuesta que se desencadena ante los cambios bruscos de temperatura. Esta respuesta consiste principalmente en elevar su concentración en la célula con el fin de permitir su interacción con las demás proteínas y evitar su desnaturalización. Algunas evidencias sugieren que las proteínas se pliegan de manera anormal en ciertas enfermedades infecciosas como el mal de las "vacas locas" o la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o en enfermedades neurodegenerativas humanas como la enfermedad de Alzheimer.

4.1 Síntesis proteica

La síntesis de proteínas o traducción del ARN_m es el proceso anabólico mediante el cual se forman las proteínas a partir de los aminoácidos. Es el paso siguiente a la transcripción del ADN a ARN_m. Existen 20 aminoácidos diferentes y sólo hay cuatro nucleótidos en el ARN_m (Adenina, Uracilo, Citosina y Guanina). La síntesis de las proteínas comienza con la unión entre sí de dos aminoácidos y continúa por el agregado de nuevos aminoácidos.

La traducción reside en el **código genético**, compuesto por combinaciones de tres nucleótidos consecutivos o **tripletes** en el ARNm. Los distintos tripletes se relacionan específicamente con tipos de aminoácidos usados en la síntesis de las proteínas. Cada triplete constituye un **codón**: existen en total 64 codones, 61 de los cuales sirven para cifrar aminoácidos y 3 para marcar el cese de la traducción (59). Los tripletes que codifican aminoácidos se denominan codones. La confirmación de esta hipótesis se debe a Nirenberg, Ochoa y Khorana (36). Generalmente los codones que representan a un mismo aminoácido se parecen entre sí y es frecuente que difieran sólo en el tercer nucleótido.

En la biosíntesis de proteínas se pueden distinguir las siguientes etapas:

1. Activación de los aminoácidos.

2. Traducción:

2.1 Iniciación de la síntesis.

2.2 Elongación de la cadena polipeptídica.

2.3 Terminación de la síntesis.

3. **Asociación de varias cadenas polipeptídicas** y a veces de grupos prostéticos, grupos orgánicos no proteicos que constituyen las proteínas funcionales.

ARN mensajero es el que lleva la información para la síntesis de proteínas, es decir, determina el orden en que se unirán los aminoácidos (59). La síntesis de proteínas o traducción tiene lugar en los ribosomas del citoplasma celular. Los aminoácidos son transportados por el ARN de transferencia (ARN_t), específico para cada uno de ellos, que son llevados hasta el ARN mensajero (ARN_m), donde se aparean al codón de éste por el anticodón del ARN de transferencia debido a la complementariedad de bases; y de ésta forma se sitúan los aminoácidos en la posición que les corresponde. Una vez finalizada la síntesis de una proteína, el ARN mensajero queda libre y puede ser traducido de nuevo. Es muy frecuente que antes de que finalice la síntesis de una proteína ya está comenzando otra, con lo cual, una misma molécula de ARN mensajero, está siendo utilizada por varios ribosomas simultáneamente (36).

1. Activación de los aminoácidos:

Los aminoácidos en presencia de la enzima aminoacil- ARN_t -sintetasa y de ATP son capaces de unirse a un ARN_t específico y dan lugar a un aminoacil- ARN_t , liberándose AMP, fosfato y quedando libre la enzima, que vuelve a actuar.

2.1 Traducción. Iniciación de la síntesis de proteínas:

Es la primera etapa de la traducción o síntesis de proteínas. El ARN_m se une a la subunidad menor de los ribosomas. A éstos se asocia el aminoacil- ARN_t , gracias a que el ARN_t tiene en una de sus asas un triplete de nucleótidos denominado anticodón de iniciación, que se asocia con el primer triplete AUG, codón de iniciación en el codón del ARN_m , según la correspondiente complementariedad de las bases. A este grupo de moléculas se une la subunidad ribosómica mayor, formándose el complejo ribosomal o complejo de iniciación activo. Todos estos procesos están catalizados por los llamados factores de iniciación FI (36).

2.2 Elongación de la cadena polipeptídica:

El complejo ribosomal posee dos sitios de unión o centros. El centro peptidil o sitio P, donde se sitúa el primer aminoacil- ARN_t y el centro aceptor de nuevos aminoacil- ARN_t o sitio A. El radical carboxilo ($-COO^-$) del aminoácido del sitio P se une con el radical amino (NH_3^+) del aminoácido del sitio A mediante el enlace peptídico. Esta unión es catalizada por la enzima peptidil-transferasa. El sitio P queda ocupado por un ARN_t sin aminoácido, entonces el ARN_t sin aminoácido sale del ribosoma y se produce la translocación ribosomal. El dipeptil- ARN_t queda ahora en el sitio P. Todo ello es catalizado por los factores de elongación (FE) y requiere de energía, la cual se obtiene del GTP. Según la combinación de nucleótidos del tercer codón, aparecerá el tercer aminoacil- ARN_t y ocupará el sitio A, se formará el tripéptido en A y el ribosoma realizará su segunda translocación, de la misma forma como se llevó a cabo la primera. Estos pasos se repiten hasta cientos de veces, según el número de aminoácidos que contenga el polipéptido (36).

2.3 Terminación de la síntesis de la cadena polipeptídica:

El final de la síntesis se lleva a cabo cuando en el ARN_m se encuentran los llamados tripletes sin sentido, UAA, UAG y UGA, para los cuales no existe ningún aminoacil ARN_t cuyo anticodón sea complementario de ellos y, por lo tanto, la biosíntesis del polipéptido se interrumpe. Lo cual indica que la cadena polipeptídica se ha terminado de sintetizar. Este proceso viene regulado por los factores R. Un ARN_m, si es lo suficientemente largo, puede ser leído o traducido, por varios ribosomas a la vez, uno detrás de otro. Al microscopio electrónico, se observa como un rosario de ribosomas, que se denomina polirribosoma (36).

3. Asociación de varias cadenas polipeptídicas para constituir las proteínas:

Conforme se va sintetizando la cadena polipeptídica, ésta va adoptando una determinada estructura secundaria y terciaria mediante los enlaces no covalentes por puente de hidrógeno y los enlaces covalentes disulfuro, respectivamente. Así la cadena polipeptídica adquiere una configuración espacial determinada (36).

Tras la traducción hay proteínas catalíticas que ya son activas y otras que precisan eliminar algunos aminoácidos para serlo. Generalmente se separa el aminoácido metionina o aminoácido iniciador. Algunas enzimas precisan asociarse a iones o coenzimas (grupo prostético) para ser funcionantes o activas. Las proteínas pueden estar constituidas por una sola cadena polipeptídica o por varias cadenas polipeptídicas denominadas subunidades. Las subunidades pueden ser iguales o distintas, según provengan del mismo gen o de genes diferentes (36). Este arreglo tridimensional corresponde a la estructura cuaternaria.

El control de calidad del plegamiento de las proteínas para adquirir la estructura cuaternaria o conformación tridimensional, se lleva a cabo por chaperonas y proteasas. Las proteínas chaperonas tienen la función de plegar o replegar correctamente a las proteínas recién sintetizadas, modificación postraducciona, las proteasas deben degradar aquellas proteínas que a pesar de la acción de las chaperonas no se pliegan correctamente. Cuando los mecanismos de control fallan, las proteínas dañadas se acumulan causando enfermedades amiloidogénicas (36).

4.2 Proteínas de respuesta al estrés y chaperonas moleculares

Las HSP siempre están presentes en las células, aunque su concentración aumenta en situaciones de estrés. Un tipo de HSP son las *chaperonas*, que son unas proteínas que ayudan al plegamiento de otras recién sintetizadas en el proceso síntesis de proteínas (36). Estas chaperonas no forman parte de la estructura primaria de la proteína funcional, sino que sólo se unen a ella para ayudar en su plegamiento, ensamblaje y transporte en la célula, donde la proteína realiza su función. Los cambios de conformación tridimensional de las proteínas

pueden estar afectados por un conjunto de varias chaperonas que trabajan coordinados, dependiendo de su propia estructura y de la disponibilidad de las chaperonas (36).

Cuando se inicia la síntesis de cualquier proteína en un ribosoma, en forma simultánea se adhieren a ella moléculas de HSP, con la finalidad de regular la conformación tridimensional y así asegurar una configuración normal que le permita a esa proteína ejercer su función y/o prepararla para ser adecuadamente secretada; impide el tránsito a través del citoplasma de otras moléculas que puedan adherirse a ella, alterando su estructura o bloqueando su función (39).

En este proceso de protección, la HSP70 puede requerir de la ayuda de otras HSP como la TCP-1 o como la HSP70 u otras pertenecientes a los complejos HSP60 y HSP10; las cuales permiten terminar su plegamiento o bien para poder ingresar a un organelo como la mitocondria. Por eso todas ellas han recibido el nombre de moléculas chaperonas (39).

La producción de las HSP se inicia tanto por el efecto de factores de transcripción conocidos como HSF1 y HSF2 (39), el HSF1 con el calor u otro factor de estrés se une a un segmento específico del DNA para inducir la iniciación de la síntesis de las diferentes HSP. En condiciones normales, la producción de las pequeñas cantidades de HSP se induce por el HSF2 (39).

Un caso especial es el relacionado con los virus oncogénicos, cuando éstos se replican dentro de una célula generan simultáneamente la producción de una proteína, la pp60src, que a nivel celular regula estimulando el crecimiento y la división celular. El virus genera igualmente la producción de dos proteínas, la HSP50 y la HSP90, que se unen a la pp60src para mantenerla inactiva y protegida, liberándola únicamente cuando se aproxima a la membrana celular; en donde debe ejercer su acción de estímulo al crecimiento celular. La HSP90 regula igualmente el funcionamiento del receptor celular para los esteroides (39).

4.3 Función en condiciones de estrés

El estrés induce a la desnaturalización y, si éste no se evita, la proteína desnaturalizada deja de funcionar y será rápidamente catabolizada. El proceso de destrucción de las proteínas desnaturalizadas es adelantado por el sistema de las ubiquitinas las cuales se unen a las proteínas y sirven de puente de unión entre ellas y diferentes proteasas (39). Bajo el efecto de cualquier factor estresante, la célula inicia de inmediato la producción de las HSP que se acumulan en el nucléolo, lugar de formación de los ribosomas que son responsables de la síntesis de proteínas.

Las HSP protegerán a las proteínas que se sintetizan a partir de ese momento y además, pueden unirse a las ya desnaturalizadas para bloquear la unión de las ubiquitinas, impidiendo la unión de proteasas y facilitando la

restauración de la estructura de la proteína desnaturalizada, requiere de las chaperonas las moléculas formadas en respuesta a una agresión, como lo son los anticuerpos o las moléculas HLA requieren de las HSP para poder ser excretadas o lograr llegar a la membrana celular sin ser alteradas durante su tránsito por el citoplasma (39).

A los anticuerpos los protege la proteína llamada Bip, y a las moléculas HLA, la llamada cadena invariante. Diversas bacterias producen dos tipos de HSP, GroEL (HSP10) y GroES, (HSP60) que se ubican en las mitocondrias y que son necesarias para la reproducción de algunos virus (39).

La medida de los niveles de diferentes HSP es indicativa del grado de estrés de una célula y permite definir, en estados de sepsis, por ejemplo, la severidad de la afección, sirviendo por ende como parámetro de evaluación en el tiempo de la intensidad del proceso séptico y de su eventual pronóstico.

4.4 Función molecular de las Chaperoninas

Las chaperoninas protegen la función y la estructura de las células a través de la protección de sus componentes (44). El gasto energético que se produce durante el ciclo de GroEL no incide directamente sobre la función de la chaperonina en la asistencia en el plegamiento de proteínas, sino que solo sirve para mantener activo el ciclo. GroEL y las chaperoninas en general no son enzimas, pues no modifican covalentemente al sustrato con el que interactúan, sino que permiten que dentro de su cavidad el polipéptido desnaturalizado pueda alcanzar libremente su estructura nativa (30).

Esta puede ser alcanzada por parte del polipéptido dentro de la cavidad, o fuera de ella después de su liberación. Puede también que el polipéptido desnaturalizado se mantenga en esta conformación después de una primera interacción con la chaperonina, en cuyo caso puede ser reconocido otra vez por ésta, con lo que vuelve a intentar su plegamiento (56).

El mecanismo de GroEL es ineficiente ya que genera un gasto continuo de ATP independientemente de que existan o no moléculas de sustrato desnaturalizado en la cavidad de la chaperonina; no siempre repliega a la proteína en un solo ciclo de interacción pero en contrapartida funciona para un rango muy grande de sustratos por lo que puede ayudar a replegar a cualquier proteína con un peso molecular menor de 50 kDa; se desconoce que pasa con aquellas proteínas de mayor peso molecular.

Se ignora también la cantidad de sustrato que en un momento determinado puede plegar la población de GroEL de una célula. Se ha sugerido que GroEL, "in vivo", sólo puede plegar el 10% de las proteínas que requieren de ayuda y se desconoce quién pliega el 90% restante de proteínas.

Siendo GroEL una máquina molecular muy compleja, lleva a cabo mecanismos muy sofisticados, como los cambios que se producen en su funcionamiento durante periodos de choque térmico. GroEL y la mayor parte de las chaperoninas del grupo I son proteínas del choque térmico y ven inducida su producción, hasta diez veces, durante los momentos en que se produce el Choque Térmico; para tratar de interaccionar con el mayor número de proteínas que se desnaturalizan por el aumento de temperatura (30).

Sin embargo, no parece tener sentido que estas proteínas sean renaturalizadas para que vuelvan a ser desnaturalizadas si el choque térmico es prolongado. Ahora se conoce que al aumentar la temperatura, la unión de la cochaperonina GroES a GroEL es más fuerte (56), de tal manera que está tarda más en liberarse y mantiene encerrado el polipéptido por más tiempo en la cavidad.

Este mecanismo diferente se debe a un cambio conformacional inducido por la temperatura, que altera la señal de liberación de la cochaperonina que envía un anillo al otro. Este fenómeno y quizás algún otro que resta por caracterizar explicaría por qué las chaperoninas están constituidas por dos anillos, cuando cada uno de ellos por separado podría formar una unidad funcional en la asistencia al plegamiento (30).

CAPITULO 5

APLICACIONES MÉDICAS DE LAS HSP

Este nuevo grupo de moléculas que han venido adquiriendo especial interés en los últimos cinco años, por las implicaciones que tienen en una gran variedad de mecanismos biológicos como el control de la respuesta inmunitaria, la patogenicidad de varios microorganismos y las relaciones huésped-paciente en los procesos infecciosos (39).

Su estudio está explicando importantes mecanismos metabólicos y abriendo las puertas para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento en procesos infecciosos, malignos e isquémicos. Los factores que desencadenan su incremento hablan por sí solos de las posibles aplicaciones de su cuantificación tales como medición de contaminantes ambientales o sustancias tóxicas (39).

Parece factible entonces, que la aplicación terapéutica de HSP pueda llegar a servir para controlar, ya sea estados sépticos severos, así como isquémicos a nivel del corazón o del cerebro y así permitir una mejor recuperación tisular al restablecerse, aunque sea parcialmente, la circulación o la nutrición del tejido afectado (39). Por otra parte, la dosificación de HSP puede ser un indicativo de fenómeno tóxico por el empleo de un medicamento y por ende su titulación permite establecer límites de riesgo.

La invasión por microorganismos responsables de la malaria, la tuberculosis, la leishmaniasis, la lepra o la esquistosomiasis, que en su hábitat natural o transitorio viven a temperaturas inferiores a las del cuerpo humano, genera al ingresar a él gran cantidad de HSP que pueden ser antigénicas y por ende protectoras, razón por la cual inducirán la producción de anticuerpos protectores. Se visualiza por lo tanto que la inyección de ciertas HSP pudiera llegar a emplearse como forma de vacunación (39).

Desafortunadamente, algunas de las HSP originadas por agentes patógenos son muy similares a las generadas por células humanas, lo cual llevaría a que los anticuerpos producidos contra ellas atacarían las proteínas del huésped, generando fenómenos autoinmunes (39).

5.1 HSP en infecciones

El ingreso de un parásito o de una bacteria al organismo humano se acompaña de un marcado incremento de diferentes HSP en el agente infectante, que le permitirán defenderse de los cambios de temperatura y de las condiciones fisicoquímicas del nuevo ambiente (39). Sin estas HSP, sus propias proteínas se desnaturalizarían y serían fácilmente degradadas.

Simultáneamente, las HSP del microorganismo inducen en el huésped la iniciación de una respuesta inmune contra ellas.

Uno de los modelos más estudiados al respecto es el del *Trypanosoma cruzi*, responsable de la enfermedad de Chagas que afecta a más de 10 millones de latinoamericanos. El estadio metacíclico o tripomastigote inoculado por el vector al humano, enfrenta al ingresar a éste un gran cambio de temperatura (de 27°C a 37°C) y una drástica modificación de su microambiente. Estos cambios se incrementan al ser fagocitado o al invadir a los macrófagos, ya que dentro del fagosoma enfrentará un pH inferior y la presencia de enzimas proteolíticas así como radicales tóxicos del metabolismo del oxígeno y del óxido nítrico (39).

Poco después, al escapar del fagosoma al citoplasma, deberá enfrentar nuevas enzimas proteolíticas. Contra todos estos factores de estrés, el parásito inicia la producción de HSP de 103, 92, 70, 75 y 60 Kd. Por su parte, el hospedero inicia una respuesta inmunitaria contra estas diferentes HSP, mediante la generación de anticuerpos y linfocitos citotóxicos (39).

Del estudio de este fenómeno se desprende la posibilidad de emplear estas HSP como antígenos para producir vacunas contra el parásito, y lo que resulta más interesante aún es que este tipo de vacunas podrían ser polivalentes y defender simultáneamente de tripanosomas y de leishmanias (39).

5.2 HSP en Bacterias

El crecimiento y la sobrevivencia de la bacteria se ven afectados por varios factores ambientales, aunque los organismos han desarrollado mecanismos protectores a condiciones desfavorables como las HSP. Recientemente se ha demostrado que bacterias sujetas a un determinado tipo de estrés favorecen la inducción de diversos metabolitos que se liberan al medio y proporcionan la capacidad de adaptar a otras células a condiciones no permisibles para la sobrevivencia de este invasor (54).

Si el *Staphylococcus aureus* es sometido a factores estresantes como temperaturas de 50°C, pH de 5.0 o hiperosmolaridad de NaCl al 10%, produce más de 8 HSP diferentes, algunas de las cuales han sido identificadas como HSP10, 20, 60, 70 y 84, y cuya función individual no ha sido aún dilucidada (39).

Bajo ciertas circunstancias, algunas HSP producidas por los microorganismos logran frenar procesos de defensa inmunológica y aún más, pueden inducir respuestas autoinmunes (39).

Se han realizado estudios con *Clostridium perfringens* (54). Consistió en que el microorganismo fue cultivado en caldo tioglicolato, en caldo de pollo y de frijoles a 37°C. Cuando los cultivos alcanzaron la mitad de la fase logarítmica,

fueron sometidos a un choque térmico de 50°C/30min. Inmediatamente después las células se centrifugaron y los sobrenadantes se colocaron en tubos con células no sometidas al estrés de temperatura. Las diferentes combinaciones de tratamientos fueron colocadas a 55°C y se tomaron alícuotas cada 15 min para determinar la viabilidad celular por el método de difusión en placa (54).

Posteriormente se realizaron ensayos para determinar la naturaleza del compuesto, estos constaron del calentamiento de los sobrenadantes a 65 y 100°C, y de la adición de tripsina con la finalidad de determinar parcialmente su naturaleza proteica. Además, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida de los sobrenadantes en condiciones disociantes y no-disociantes (54).

Los resultados observados mostraron que el sobrenadante de células estresadas por un choque térmico de 50°C por 30 min, provocó una mayor termotolerancia a 55°C que las células no estresadas. Cuando el sobrenadante de células estresadas se sometió a calentamiento (65 o 100°C), así como también, a la adición de tripsina hubo la pérdida de la capacidad termoprotectora. Se encontraron tres proteínas en los sobrenadantes estresados, de 23 Kd, 50 Kd y 125 Kd (54).

Se tiene evidencia que la aplicación de un choque térmico de 50°C por 30 min. en *C.perfringens* induce la producción de proteínas del estrés específicas. Se ha demostrado en otras bacterias, que esas proteínas intervienen en funciones de protección de las células para su capacidad de sobrevivencia a temperaturas normalmente letales, desarrollándose el fenómeno de adquisición de termotolerancia (54).

Las curvas de sobrevivencia demostraron que la exposición de las células y sobrenadantes a condiciones subletales, las hacía más tolerantes a la temperatura de 55°C en comparación con los otros tratamientos (54).

Los resultados indicaron la presencia de componentes en el sobrenadante que pudieran ser los responsables de dicha termoprotección. Investigaciones anteriores mencionaron que estos metabolitos podían tener una composición similar a una gran cantidad de compuestos celulares como proteínas, aminoácidos, ácido nucleicos y lipopolisacáridos, sin embargo, se ha determinado que hay algunas proteínas involucradas en esta protección debido a su inactivación con altas temperaturas y su digestión con proteasas (54).

El estudio de estos compuestos tienen implicación importante en la industria de alimentos, por lo que el estudio extensivo de estos compuestos es de gran ayuda para poder controlar a los microorganismos enteropatógenos y, por lo tanto las enfermedades que estos provocan (54).

5.3 HSP en Virus

La participación de las HSP en las infecciones virales tiene connotaciones diferentes. Los virus no poseen genes que les permitan producirlas, pero suelen inducir en el huésped un incremento en la producción de las que normalmente se generan en éste, con el agravante de que este tipo de reacción induce fenómenos autoinmunes (39). En las células infectadas por virus es importante producir las HSP del huésped para la generación de respuesta inmune celular específica, dado que están involucradas en el transporte de péptidos inmunodominantes en el retículo endoplasmático (34).

HSP en el empleo para la producción de vacunas.

- En el desarrollo de la diabetes insulino dependiente, las HSP desempeñan un papel importante. Experimentalmente se ha observado que en animales genéticamente predispuestos al desarrollo de la diabetes, ésta puede prevenirse por previa "vacunación" con la HSP60. Y si la enfermedad ya se ha desarrollado, puede detenerse o incluso lograr remisión completa (39).
- Las HSP60 y 70 originadas en *M.tuberculosis* y *E.coli* actúan como excelentes adyuvantes, incrementando la antigenicidad de péptidos y oligosacáridos con los cuales se conjugan, lo que abre la puerta para el mejoramiento de vacunas contra enfermedades infecciosas (39).
- Los receptores gd de algunos linfocitos T parecen asociarse con la HSP60 para inducir fenómenos autoinmunes en encefalitis, artritis reactivas y esclerosis múltiple. Otra de estas proteínas, la HSP65, ha sido asociada más directamente con las artritis reactivas que se presentan en algunos pacientes con infecciones por salmonelosis, tuberculosis o lepra. La importancia de este fenómeno radica en el hecho de que la "vacunación" experimental con esta proteína previene el desarrollo de la artritis y lo que posiblemente sea de mayor interés es el hecho de que si ésta se ha presentado puede mejorarse y/o curarse (39).

Otro campo de reciente interés es el relacionado con la fisiopatología y posible control de tumores. Los complejos HSP-péptidos se comportan como antígenos específicos de tumores. La vacunación con estos complejos HSP-péptidos induce respuestas inmunes protectoras frente al tumor del que fueron aislados dichos complejos. Las características antigénicas de las HSP pueden ser explotadas para aumentar la respuesta inmune humoral y celular frente a proteínas de interés.

La HSP65 producida por micobacterias impide el desarrollo experimental de tumores en ratones genéticamente predispuestos a desarrollar determinado tipo de sarcomas.

Dentro de la familia HSP70 se encuentra la HSP73 que se ubica en el citosol y es expresada constitutivamente, tiene 90% de homología con las HSP72 la cual es inducible bajo condiciones de estrés (51). Se ha descrito que la expresión de HSP72 en células tumorales o células infectadas por virus es importante para la generación la respuesta inmune celular específica.

La HSP72 (forma inducible) se puede asociar a péptidos provenientes de la proteólisis intracelular en la célula tumoral, y expresarse en forma directa sobre la membrana plasmática de células tumorales de diferentes tipos de cáncer y estimula de forma específica la respuesta inmune donde sirve de blanco de las células asesinas naturales. Algunos tumores humanos tratados con calor expresan en su membrana la HSP72, lo que no hacen las células normales. Las posibles implicaciones terapéuticas de este fenómeno son obvias. Por el contrario, algunos tumores producen HSP27, que los protege de la acción del factor de necrosis tumoral (39).

5.4 EL papel metabólico de las HSP

Finalmente, se han descrito otras asociaciones entre diferentes proteínas de estrés y determinados fenómenos o procesos evolutivos o metabólicos. Así, por ejemplo,

- En la cirrosis experimental se produce en el hígado la HSP47 que tiene como función facilitar la producción de colágeno (39).
- La HSP27 tiene que ver con el desarrollo normal de la piel, en los queratinocitos y posiblemente con la defensa contra ciertos tipos de tumores intraepiteliales. Varias de las proteínas de la familia HSP70 del humano poseen una región con idéntica secuencia al segmento por el que varias moléculas HLA capturan un antígeno determinado para presentarlo a los linfocitos T. Por lo tanto, pueden actuar como moléculas presentadoras de antígenos. A nivel del citoplasma de granulocitos y macrófagos, las HSP28 y 72 propician la polimerización de la actina y por ende intervienen en la motilidad de estas células (39).
- El cristalín-a del ojo es una HSP y parece tener como función proteger del calor a las proteínas del cristalino. No obstante, si la temperatura sobrepasa los 55°C, las proteínas se alteran dando lugar a la aparición de cataratas (39).

CAPITULO 6

LAS HSP EN FRUTOS Y CULTIVOS HORTICOLAS

Otro punto interesante que hay que destacar es que las HSP son inducidas en los frutos y vegetales mediante tratamientos térmicos proporcionándole una mayor vida de anaquel (48).

Entre los factores de mayor importancia en el deterioro postcosecha de los frutos están la respiración, la producción de etileno, la transpiración y pérdida de agua, los desordenes fisiológicos, los daños físicos y daños patológicos. Diversos factores afectan el almacenamiento y transporte del aguacate como la antracnosis, presencia de *Rhizopus*, *Alternaria*, oscurecimiento; ablandamiento del fruto, **daño por frío**, entre otros (7).

El daño por frío no se manifiesta en el fruto mientras se encuentra en el almacenamiento a temperatura baja, sino aparece hasta que la fruta es transferida a temperaturas mayores; según sean las condiciones de almacenamiento; tan baja sea la temperatura, así de corto será el tiempo que la fruta puede ser almacenada sin daño alguno (28). Los síntomas de daño por frío pueden ser externos e internos se inducen por condiciones diferentes (55). Este se manifiesta por diversos síntomas como lo son: el oscurecimiento interno y externo (se presenta manchas de un color negro-café irregular en la piel), zonas de ablandamiento, zonas de inmadurez parcial o total, desarrollo de sabores extraños, y una mayor incidencia de hongos en la superficie (12, 20, 27).

Cuando el daño es leve se producen unas puntuaciones necróticas en la piel, en cambio daños severos producen manchas irregulares claramente definidas de color pardas-negras que sólo afectan la piel. El daño se inicia en el exocarpo y se desarrolla hacia la epidermis. Los síntomas aparecen en almacenaje en frío, pero se intensifican cuando la fruta es retirada del frío y puesta a alta temperatura. Este tipo de síntoma es más fácil de visualizar en cultivares de piel verde en maduración (55). Los síntomas internos se pueden manifestar como ablandamiento inadecuado, pulpa gris, pardeamiento de haces vasculares, pulpa manchada etc.

Los síntomas de daño por frío se manifiestan en fruta almacenada a 0-2°C por más de 7 días y luego puestos a temperatura ambiente, o en fruta almacenada a 3-5°C por más de 2 semanas (55).

Las lesiones que sufren las células del fruto por el frío son inducidas por dos eventos: en el evento primario las células de los frutos sensan su entorno registrando la temperatura ambiente, cuando es crítica dan como respuesta una serie de eventos secundarios como necrosis de las células y finalmente muerte celular. Cada sistema biológico tiene su rango óptimo de temperatura de almacenamiento. Si la temperatura se incrementa o se reduce fuera de dicho rango, pueden ocurrir ciertos desordenes fisiológicos los cuales causan daño a las

células del sistema; por lo que, en los procesos de almacenamiento y transporte de frutas y vegetales, la magnitud del daño esta en función de la magnitud de la temperatura extrema a la que se expone el vegetal y de la duración en la exposición a estas temperaturas extremas (16).

Las membranas lipídicas son las mayores barreras que delimitan a la célula y sus componentes. Los ácidos grasos tienen un papel importante en el daño por frío, la relación de ácidos grasos insaturados a ácidos grasos saturados en la membrana lipídica es mucho más alta en las especies tolerantes al daño frío que en las especies sensibles. Las bajas temperaturas modifican la distribución de los lípidos en la membrana causando áreas gelificadas y otras fluidas, debido a que los ácidos grasos saturados tienden a solidificarse más fácilmente por efecto de las bajas temperaturas (55). Los ácidos grasos insaturados solidifican a temperaturas más bajas que los ácidos grasos saturados, debido a ello, el efecto del estrés por frío es sobre la estructura y funcionamiento de la membrana de células, mitocondrias y cloroplastos.

El daño por frío se inicia básicamente en la estructura membranal de las células en la que sus fosfolípidos son afectados por diferentes factores. Los daños reducen la calidad del producto y acortan la vida útil. En el caso de la guayaba se observa un escaldado superficial, pudrición alternaria y obscurecimiento de las semillas (15). Las guayabas en pleno madurez de consumo son menos sensibles al daño por frío que las que se encuentran en estado verde-maduro y se les puede conservar, sin mostrar síntomas de esta fisiopatía (13).

Las respuestas directas al daño por frío, generan cambios en las propiedades físicas de la membrana celular que resultan en una serie de daños. En lugar de que ocurra una alteración uniforme en la membrana los cambios de fluidez ocurren probablemente en microdominios dentro de la membrana. Las respuestas indirectas al daño por frío, después de una exposición prolongada de especies sensibles a temperaturas bajas, los cambios en las membranas resultan en un número posibles de respuestas secundarias: Pérdida de la integridad de las membranas, salida de solutos, pérdida de compartimentalización y cambios en la actividad enzimática (32).

Se ha estudiado que la fruta más soleada en el árbol, que alcanza temperaturas entre 40-50°C, es más resistente al daño por frío (55). Se recomienda para evitar el daño por frío mantener un crecimiento equilibrado del árbol, conseguir niveles altos de calcio en el fruto y cosechar en estado óptimo de madurez, en cuanto a manejo de postcosecha almacenar la fruta a una temperatura mínima adecuada para cada variedad sin exceder su tiempo de almacenaje.

México es uno de los principales países productores del aguacate representa el 21.9% convirtiéndose en el productor número uno en el mundo (21). Uno de los principales problemas para la comercialización del aguacate Hass son

las distancias que se transporta para llegar a su destino final, ya que Michoacán y México exportan el fruto a más de 20 países en el mundo (4).

La exportación se realiza por vía marítima lo que toma hasta 28 días para llegar al país consumidor, para lo cual se somete a temperaturas de 5°C con el objetivo de prolongar su vida postcosecha, sin embargo, se presenta el inconveniente del daño por frío.

El fruto requiere de una tecnología de almacenamiento que evite el daño por frío por lo que la propuesta es la activación de las proteínas de choque térmico HSP17 y HSP70 para inhibir el daño por frío.

6.1 Almacenamiento del fruto

En la actualidad se cuenta con 3 formas de almacenamiento: Almacenamiento con atmósferas modificadas (AM), Almacenamiento con atmósferas controladas (AC) y el uso de la refrigeración que es comúnmente usado para incrementar el tiempo de almacenamiento, ya que a bajas temperaturas se reduce la velocidad de respiración y el metabolismo del fruto, prologando su vida postcosecha.

Sin embargo, el almacenamiento a bajas temperaturas durante periodos prolongados se encuentra limitado por una maduración anormal (3) y la susceptibilidad de este a sufrir daño a bajas temperaturas <6°C para aguacate manifestándose en una decoloración de la superficie, obscurecimiento de la pulpa y endurecimiento del tejido vascular, pérdida del sabor, estos síntomas no aparecen durante el almacenamiento del fruto en cuartos fríos, sino hasta que se retira de esa atmósfera (11).

Algunas frutas y cultivos hortícolas son susceptibles al daño por frío cuando se refrigeran a temperaturas inferiores a 13-16°C (37). Los daños reducen la calidad del producto y acortan la vida útil.

La tabla 4 proporciona algunos ejemplos de los síntomas de daño por frío en una variedad de cultivos. Los síntomas frecuentemente aparecen sólo después de que la mercancía se transfiere a temperaturas más altas, como ocurre durante la venta.

Tabla No.4 Susceptibilidad de frutas y hortalizas a los daños por frío cuando se almacenan a bajas temperaturas pero no de congelación.

PRODUCTO	LA MÁS BAJA TEMPERATURA SEGURA. °C	DAÑO PRODUCIDO AL ALMACENAR ENTRE 0°C Y MÁS BAJA TEMPERATURA SEGURA.
Manzanas,	2-3	Oscurecimiento interno, corazón café, colapso húmedo, escaldado suave.
Espárragos	0-2	Color verde apagado, puntas flojas.
Aguacates	4.5-13	Decoloración de la superficie, oscurecimiento de la pulpa y endurecimiento del tejido vascular, pérdida del sabor.
Plátanos verdes o maduros	11.5-13	Decoloración gris-cafezusco de la carne.
Frijoles Lima	1-4.5	Color apagado al madurar.
Vainicas	7	Manchas y áreas café herrumbroso.
Arándano agrio	2	Formación de pequeños cráteres, coloración café.
Pepinos	7	Textura hulosa, carnosidad roja.
Berenjenas	7	Formación de hoyuelos, áreas acuosas, descomposición.
Guayabas	4.5	Escaldado superficial, pudrición alternaria oscurecimiento de las semillas.
Toronjas	10	Daños en la pulpa, descomposición.
Jicama	13-18	Escaldado, hoyos, colapso acuoso.
Limonos	11-13	Descomposición, decoloración. Hoyuelos, manchas de las membranas, manchones rojos.
Limas	7-9	Hoyuelos, quemado de la piel. Decoloración grisácea de la piel, maduración irregular.
Mangos	10 13	Hoyuelos, descomposición del pie.
Sandía	4.5	Decoloración, áreas acuosas, hoyuelos, descomposición.
Aceitunas	7	Hoyuelos, manchas de color café.
Naranjas de California y Arizona	3	Hoyuelos, imposibilidad de maduración, malos sabores, descomposición.
Papayas	7	Ampollas en la cutícula, pudrición por alternaria en las vainas y cálices oscurecimiento de las semillas.
Pimientos dulces	7	Hoyuelos, oscurecimiento interno y externo.
Piñas	7-10	Color verde apagado al madurar.
Papas	3	Oscurecimiento hasta color caoba (Chippewa y Sebago), sabor dulce.
Ayotes y calabazas	10	Descomposición, especialmente por alternaria.
Camotes	13	Descomposición, hoyuelos, decoloración interna; corazón duro tras la cocción.
Tomates maduros	7-10	Textura acuosa y ablandamiento, descomposición.
Tomates pintones	13	Color pobre al madurar, descomposición por alternaria.

En el caso de los frutos de **aguacate** (6) la temperatura óptima de almacenamiento oscila entre 3 y 7°C, con una H.R. de 85-95%, temperatura más alta de congelación es de -1.6°C con una producción de etileno alta (33). Las pérdidas postcosecha de aguacate a nivel mundial se estiman en el orden de 43%, dentro de los principales factores de pérdida se encuentra: daño por frío, ablandamiento del fruto, daño por rozaduras (25, 27) y enfermedades parasitarias. Los principales síntomas de daño por frío son manchas negras en la epidermis y una decoloración gris o café obscura en el mesocarpio.

En la **guayaba** la temperatura óptima de almacenamiento oscila entre 8-10°C, con una H.R de 90-95% para las guayabas verde-maduras y parcialmente maduras y esto conduce a una vida de almacenamiento de 2 o 3 semanas (13). El almacenamiento a temperaturas inferiores a 5°C generalmente ocasiona daño por frío. Las manchas oscuras o manchado general de la superficie del fruto son manifestaciones secundarias del proceso de daño por frío.

En la **calabacita** la temperatura óptima de almacenamiento es de 5-10°C con una H.R de 95% (45). Las calabacitas no se pueden almacenar por 10 días. Se les ha almacenado a 5°C hasta por 2 semanas con una calidad aceptable para el mercadeo. El almacenamiento a temperaturas inferiores a 5°C por más de 3-4 días, generalmente ocasiona daño por frío (45). Las variedades difieren en su sensibilidad al daño por frío. Los síntomas que siguen al daño por frío son deterioro de la calidad visual y sensorial, picadura de la superficie y un progreso rápido del manchado o pardeamiento. El almacenamiento por más de dos semanas incrementa las pudriciones, el amarillamiento y el aspecto marchito, especialmente después de que las calabacitas se transfieren a las condiciones típicas de venta.

Las calabacitas son consumidas en diversos estados de madurez fisiológica son considerados como frutos inmaduros. El daño por frío es acumulativo y puede iniciarse en el campo antes de la cosecha. Las calabacitas Zucchini están consideradas como las más tolerantes al frío. Otros tipos pueden mantener una mejor calidad durante periodos de almacenamiento de 10 a 14 días y a temperaturas ligeramente mayores 7.2°C con una H.R 95% (45).

El almacenamiento o el embarque en atmósferas controlada o modificada ofrecen poco beneficio en la conservación de la calidad de las calabacitas. Las bajas concentraciones de O₂ 3-5% retrasan el amarillamiento de las variedades verde oscuro y el inicio de las pudriciones por unos pocos días. La calabacita Zucchini tolera elevadas concentraciones de CO₂ hasta un 10% pero la vida de almacenamiento no se extiende mucho. Las concentraciones de CO₂ iguales o mayores de 5% reducen la sensibilidad al daño por frío en Zucchini (45).

En el **mango** la temperatura óptima es de 10-13°C con una H.R de 85-90% altamente sensible al almacenamiento a bajas temperaturas de 10°C. Los síntomas del daño por el frío en mango incluyen decoloración, deterioro,

maduración irregular, desarrollo de color y sabor pobre y aumento de la susceptibilidad a las enfermedades (50).

La **naranja** con una temperatura óptima de almacenamiento de 10-13°C. Sufre daño por frío cuando es almacenado por debajo de los 12°C presentándose hoyuelos, imposibilidad de maduración, malos sabores, descomposición, etc.

En el **Jitomate** las temperaturas óptimas son: Verde Maduro 12.5-15°C, Rojo Claro 10-12.5°C y Maduro Firme 7-10°C con una H.R de 90-95%. Los tomates Verde Maduro pueden almacenarse a 12.5°C por 14 días antes de madurarlos sin reducción significativa de su calidad sensorial y desarrollo de color. La pudrición aumenta si se almacena más de dos semanas a esta temperatura. Después de alcanzar el estado Maduro Firme, la vida de anaquel es de 8 a 10 días si se aplica una temperatura dentro del intervalo recomendado (47). Durante la distribución comercial es posible encontrar que se aplican temperaturas de tránsito o de almacenamiento de corto plazo inferiores a lo recomendado, pero es muy probable que ocurra daño por frío después de algunos días (49). Los tomates son sensibles al daño por frío a temperaturas inferiores a 10°C si se les mantiene en estas condiciones por 2 semanas o a 5°C por un período mayor a los 6-8 días. Los síntomas del daño por frío son alteración de la maduración (incapacidad para desarrollar completo color y pleno sabor, aparición irregular del color o manchado, suavización prematura), picadura y pardeamiento de las semillas e incremento de pudriciones (49).

La **chirimoya** tiene una temperatura óptima de 8-12°C con una H.R de 90-95%. La exposición de las chirimoyas a temperaturas inferiores a 8-12°C, dependiendo del cultivo y estado de madurez, producen daño por frío (40). Los síntomas incluyen un oscurecimiento y endurecimiento de la cáscara, depresiones, incapacidad de desarrollar buen sabor y pulpa "harinosa". Las chirimoyas se pueden mantener hasta 6 semanas a 10°C en 5% O₂ y posteriormente maduras a 20°C.

En el **pepino** la temperatura óptima de almacenamiento oscila entre 10-12.5°C, con una H.R de 95%. El pepino se almacena por menos de 14 días ya que pierde calidad visual y sensorial. Después de dos semanas se incrementan las pudriciones, el amarillamiento y la deshidratación, especialmente después que los frutos se transfieren a las condiciones normales de venta. El almacenamiento por corto plazo o la temperatura de 7.2°C se usa comúnmente, pero produce daño por frío después de 2 a 3 días. Los pepinos son sensibles al daño por frío a temperaturas inferiores a 10°C si se les mantiene en estas condiciones por más de 3 días, dependiendo de la temperatura específica y del cultivar. Las manifestaciones del daño por frío son áreas translúcidas y de apariencia acuosa, picadura y pudrición acelerada (46). Las variedades de pepino difieren en la susceptibilidad a esta fisiopatía.

El **plátano** tiene una temperatura óptima de almacenamiento de 13-14°C con una H.R de 90-95%. El daño por frío es causado por la aplicación de temperaturas inferiores a 13°C por unas pocas horas o días, dependiendo del cultivar, grado de madurez y temperatura (42). Los síntomas incluyen color de la piel amarillo grisáceo y opaco, el tejido subepidérmico presenta vetas de color pardo oscuro, problemas para madurar y en casos severos, pardeamiento de la pulpa (52).

En la **piña** la temperatura óptima de almacenamiento es de 10-13°C para piñas parcialmente maduras y 7-10°C para piñas maduras con una H.R de 85-90%. La exposición de las piñas a temperaturas inferiores a 7°C puede producir daño por frío. Las frutas maduras son menos susceptibles que las inmaduras o las parcialmente maduras. Los síntomas incluyen color verde opaco, áreas translúcidas o de apariencia acuosa en la pulpa, oscurecimiento del tejido del corazón, mayor susceptibilidad a las pudriciones, y marchitamiento y pérdida de color de las hojas de la corona. El Manchado pardo interno o corazón negro se le asocia con la exposición de las piñas a bajas temperaturas antes o después de la cosecha; por ejemplo a 7°C por una semana o más (41).

En los frutos tropicales y subtropicales los tejidos sufren de daño por frío durante el almacenamiento al ser expuestos a bajas a temperaturas de 0-15°C, causando alteraciones fisiológicas. Estas alteraciones son reversibles cuando el almacenamiento es por tiempos cortos, pero se hacen irreversibles dependiendo del tiempo de exposición (23). Por lo que el grado de daño por frío depende de la temperatura de exposición y la sensibilidad de las especies a las temperaturas de refrigeración (14).

6.2 Tratamientos Térmicos

Se ha encontrado que las altas temperaturas aumentan la tolerancia de los tejidos sensibles al frío (50). Una alternativa para reducir el daño por frío y reducir la carga microbiana, es la exposición del fruto a tratamientos térmicos con temperaturas de 38°C a 40°C antes de almacenarlos a bajas temperaturas.

El Choque térmico se da en dos fases: La exposición del fruto a tratamientos térmicos consiste en la exposición de temperatura de 38°C-40°C por un tiempo de 30-240 minutos tiene como finalidad inducir la expresión de los genes hsp17 y hsp70 responsables de codificar para las proteínas de choque térmico HSP17 y HSP70 (48), las cuales conferirán termotolerancia al fruto evitando que este se dañe y exponer al fruto a 50°C para reducir la carga microbiana.

La Termotolerancia adquirida se define como la capacidad de las células de sobrevivir a un tratamiento mortal con alta temperatura, debido al tratamiento previo con una temperatura alta subletal (43).

Cada tratamiento está en función de las características de transferencia de calor del fruto, tamaño, forma, tipo de contenedor del fruto, la densidad del tejido del fruto y sobre todo las características de calor del medio (2).

Los tratamientos térmicos pueden ser aplicados a frutas y vegetales en diversas formas: exposición en agua caliente, vapor saturado, aire seco, radiación infrarroja y radiación de microondas. La aplicación de dichos tratamientos térmicos les confiere termotolerancia a los frutos (24) inhibiendo el daño por frío por acción de las HSP (25).

La inmersión en agua a temperatura moderada o los tratamientos con aire forzado húmedo pueden ser tratamientos alternativos para aquellos frutos sensibles al calor. El uso de tratamientos térmicos además de evitar el daño por frío se ha usado en los últimos años para el control de plagas, ataque por hongos patógenos y para alterar el proceso de maduración, ocasionando un retraso en el mismo.

Las condiciones ambientales como la temperatura, luz, disponibilidad de agua o balance hormonal en las plantas, tiende a modificar la expresión de genes y a nivel molecular, una de las respuestas mejor caracterizadas es la respuesta a las altas temperaturas o choque térmico (24). La respuesta del choque térmico es una reacción conservada de las células y organismos a temperaturas elevadas (choqué o estrés térmico); las respuestas provocadas por dichos fenómenos son las siguientes:

- a) Los organismos y las células se protegen contra daños severos.
- b) Se restablecen las actividades fisiológicas de la célula en forma normal.
- c) Se incrementan los niveles de termotolerancia.

La respuesta al choque térmico se encuentra ligada a otros tipos de estrés, ya que produce protección contra deshidratación, daño por frío y por congelamiento, metales pesados y estrés oxidativo en plantas (22). Tratamientos con aire o agua caliente han reducido el daño por frío en **mango, naranja y jitomate** con tratamientos con agua caliente a 42°C por 1h, y aire a 38°C por 2 días y almacenados a 2°C, para ser madurados a 20°C. Los frutos tratados no sufren daño por frío, mientras que los frutos no tratados sufren daño por frío en el 63% (26). Se ha sugerido que la exposición de los tejidos de las plantas a un estrés puede proteger la planta de otro estrés (18). La temperatura antes del almacenamiento a baja temperatura puede prevenir el desarrollo de daño por el frío en frutos de mango al estado verde; sin embargo, temperaturas sobre 46°C pueden causar daños por el calor (50).

En la Guayaba la inducción de HSP durante 30 minutos a 38°C es favorable para mantener un fruto sin daño por frío durante su almacenamiento. Sin embargo, cuando es el fruto es sometido a 60 minutos no es factible para evitar el daño en el fruto durante todo el almacenamiento.

Un tratamiento con calor a 35°C por un día reduce los síntomas de daño por frío en piñas transportadas a 7°C debido a que limita la actividad de polifenoloxidasas y consecuentemente el pardeamiento del tejido (41).

Mientras que la temperatura a 50°C tiene como objetivo principal la reducción de carga microbiana involucrada en el deterioro del fruto durante el almacenamiento. La combinación de ambos tratamientos llevará a prolongar la vida de anaquel del fruto, conservando sus atributos de calidad (48).

En el aguacate temperaturas de 35 y 45°C reducen la actividad de la enzima polifenoloxidasas (PPO) es la responsable de los pardeamientos al oxidar los fenoles en quinonas y melanina (45). Los tratamientos por debajo de los 50°C no disminuyen la calidad del color, textura y sabor del fruto. Por lo tanto los frutos expuestos a una temperatura de 50°C por 10 y 20 minutos no afecta la calidad fisicoquímica y sensorial de las mismas incrementando el tiempo de almacenamiento.

En el caso del fruto de aguacate es de suma importancia el contenido lipídico que este presente; el choque térmico no afecta el porcentaje de ácidos grasos contenidos en los frutos de aguacate Hass manteniéndose éste a lo largo del tiempo de almacenamiento del fruto, conservando el fruto su principal atributo de calidad (17).

La temperatura óptima de expresión de las HSP por un tratamiento térmico es de 38°C por periodos de al menos 2h, para lograr los efectos de retardamiento de la maduración y reducción del daño por frío son necesarios periodos entre 6h y 12h (11) mientras que la expresión de las HSP en forma natural por la incidencia de la luz solar fue demostrada cuando el fruto de aguacate tiene al menos 4h con temperaturas internas mínimas de 37°C.

Los tratamientos térmicos reducen las tasas de respiración de los tomates y pepinos expuestos a bajas temperaturas. En mangos, los tratamientos térmicos aparentemente afectan la respiración pero no la magnitud del climaterio (19).

El etileno es un compuesto gaseoso vegetal que tiene un rol en la vida poscosecha de los productos frutihortícolas, a menudo nocivo acelera la senescencia, a veces es benéfico mejora la calidad del producto al promover una maduración más rápida y uniforme antes de su distribución. La producción de etileno se ve inhibida cuando el fruto es sometido a temperaturas mayores de 35°C por largo tiempo, pero puede exceder los niveles normales si el fruto es transferido a una temperatura que no le cause estrés (5). Temperaturas mayores de 35°C causan una acumulación endógena de ácido 1-amino-ciclopropano (AAC) en algunos frutos con una reducción en la producción de etileno. La conversión de AAC a etileno es aparentemente muy susceptible al daño por calor.

Los frutos expuestos a prolongados periodos de tiempo a altas temperaturas rápidamente recobran su habilidad para la síntesis de etileno, frecuentemente los niveles de etileno se incrementan más que los frutos que no fueron tratados por calor. Cuando la producción de etileno endógeno también es inhibida los frutos no responden posteriormente al etileno endógeno. Esto indica la pérdida o inactivación de los receptores de etileno, o bien, la incapacidad para transferir la señal para la serie secuencial de eventos que permitan la maduración (18). La producción de etileno en **tomate** a tratamientos térmicos y posteriormente almacenados por 3 semanas a 2 ° C tiene niveles de evolución en el etileno más alto que los frutos no tratados. En el **mango** la producción de etileno después de los tratamientos térmicos es inhibida (19). En estudios realizados en mango tratados a 38°C por 3 días, se observó que la producción de etileno es similar a la presentada por los frutos climatéricos, aunque no es idéntica.

La presencia de las HSP puede detectarse en un intervalo que va de 3–10 minutos después de la exposición del fruto a altas temperaturas. La síntesis de las HSP incrementa con el aumento en la temperatura y la temperatura máxima de síntesis posiblemente coincide con la temperatura óptima de crecimiento de cada especie. La producción de las HSP depende de la fisiología de cada uno de los organismos. Ciertas proteínas normales de la célula son homólogas a las HSP y no muestran incremento en su expresión como respuesta a altas temperaturas.

Después del tratamiento fitosanitario, los frutos de aguacate son sometidos al “Choque térmico”, el cual consiste en colocar los frutos por inmersión en agua contenida en una cisterna a una temperatura de 38°C por una hora. Posteriormente se sumergen en una segunda cisterna con agua, a una temperatura de 50°C por 10 minutos (48).

Una vez realizado el tratamiento de choque térmico, los frutos pasarán a través de una banda transportadora acondicionada con aire para el secado de los frutos, para finalmente ser empacados. Una vez que el fruto ha sido empacado se procede al almacenamiento, considerando un período máximo de 28 días bajo el cual el aguacate conservará sus características de calidad idóneas para la comercialización del mismo.

En la **chirimoya** se han hecho estudios para alargar la vida de anaquel a través de un mecanismo donde el fruto sea más resistente al frío. Como se trata de un fruto subtropical no puede almacenarse y transportarse a la misma temperatura de conservación que otros frutos como el aguacate, que sí resisten las bajas temperaturas (29). Con la refrigeración se logró incrementar por 7 días el período de maduración, este tiempo no es suficiente para que el fruto traspase las fronteras y llegue en buen estado a los consumidores. Se planteó que este fruto responde con un sistema de defensa a situaciones de estrés como es el frío y aseguró que las bajas temperaturas inducen una respuesta a nivel celular promoviendo las síntesis de las HSP. Actualmente se ha estudiando las condiciones para que la chirimoya “sobre exprese” estas proteínas, es decir, que su concentración sea mayor de lo normal, y puedan tolerar temperaturas más

bajas. Como es un fruto poco conocido a nivel mundial, se tiene que caracterizar las HSP en la chirimoya, para inducir su síntesis y evaluar el mecanismo de resistencia al frío durante la maduración de los frutos (35).

Las HSP son miembros de una superfamilia de multigenes en la cual no todos los miembros son regulados por calor. Las HSP abarcan un grupo de polipéptidos ubicuos que se inducen cuando la célula se sujeta a condiciones agotadoras como las altas temperaturas, presiones elevadas, compuestos tóxicos, etanol, análogos de aminoácidos, falta de glucosa, ionóforos de calcio etc. La actividad de las HSP implica el acompañamiento correcto de las cadenas del polipéptido atando a los residuos hidrofóbicos expuestos y participan en su transporte de uno a otro organelo de la célula, al mismo tiempo que impiden su interacción con otras moléculas.

Estas actividades conservan el plegamiento de las proteínas recién sintetizadas y con el transporte de las mismas hacia el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y la membrana. Por esta función de plegarse a otras moléculas y acompañarlas hasta su destino se les denomina chaperonas moleculares (57).

Además están implicadas en la protección del tejido del aguacate al daño tisular producido por el frío (temperaturas de 0-6°C), las HSP estimulan la glicosilación de las proteínas (25, 26). Si embargo, su regulación y mecanismos moleculares no se han dilucidado. Los organismos eucariotes y procariotes responden frente a estímulos potencialmente dañinos, tales como temperaturas elevadas, aumentando la síntesis de HSP (57). Como una consecuencia de su función chaperona, las HSP se encuentran asociadas a un amplio espectro de péptidos derivados de las células de las que estas proteínas se aíslan.

Su función chaperona se da cuando se inicia la síntesis de cualquier proteína en un ribosoma, en forma simultánea se adhieren a ella moléculas de HSP con el propósito de regular su conformación nativa para asegurar que una configuración normal permita a esa proteína ejercer su función y/o prepararla para ser adecuadamente excretada, impidiendo que en su tránsito a través del citoplasma otras moléculas puedan adherirse a ella alterando su estructura o bloqueando su función (39). En este proceso de protección la HSP70 puede requerir la ayuda de otras HSP como la TCP-1, otras HSP70 u otras pertenecientes a los complejos HSP60 y HSP10 para terminar su plegamiento o para ingresar a la mitocondria.

Las HSP facilitan y permiten una amplia diversidad en procesos como son transporte de proteínas y actividad de receptores. La ubiquitinina es una proteína que depende del ATP y está relacionado con la proteólisis intracelular. Estas proteínas con excepción de la ubiquitinina se caracterizan por su incremento de expresión como respuesta a alta temperatura (39), algunos de ellos se encuentran en niveles significativas en condiciones normales, en células no sujetas a condiciones adversas, o bien, son producidas en estados particulares del ciclo celular o durante el desarrollo.

Sus tasas de síntesis aumentan cuando el organismo se encuentra sometido a estímulos estresantes que pueden o no proceder del medio ambiente (36) por ejemplo el calor , la falta de alimentos, radicales libres, infecciones, etc.

Algunos miembros de la familia HSP70 y HSP90 participan activamente en el transporte hacia el retículo endoplasmático, de las cadenas peptídicas que forman los receptores (TCR y BCR) de los linfocitos T y B. Participan en la biosíntesis de los complejos que están formadas por los antígenos de histocompatibilidad propias más los oligo-péptidos que resultan de la digestión enzimática de antígenos extraños. Las HSP90 participan en el transporte de los receptores para las hormonas esteroides y se mantiene unida a los mismos en el núcleo de las células (38).

CONCLUSIONES

1. Los resultados encontrados en la literatura muestran a las chaperoninas como unas máquinas moleculares con una arquitectura ideada por la naturaleza para tratar un problema general, el del **plegamiento de proteínas**, utilizando para ello un mecanismo que aunque ineficiente desde el punto de vista energético se adapta a un gran número de proteínas. Durante la evolución natural de los organismos, esa misma arquitectura ha sido utilizada por otra chaperonina para tratar de forma específica y muy eficiente el problema del plegamiento de dos proteínas citoesqueléticas vitales para la célula como son la actina y la tubulina (1).

2. Las proteínas de choque térmico están siempre presentes en las células en un nivel bajo, pero son fabricadas en cantidades mayores cuando las células son estresadas por el calor u otros factores ambientales. Estas proteínas reparan otras que están adversamente afectadas por condiciones ambientales, y son parte de la reacción normal de las células al estrés. No obstante, si se producen con demasiada frecuencia o durante tiempo prolongado, se les conoce por causar cáncer.

3. El tratamiento de choque térmico en los frutos como tecnología de almacenamiento logran la activación de las proteínas de choque térmico HSP17 y HSP70 para inhibir el daño por frío al exponer a productos hortofrutícolas a temperaturas bajas para retardar el proceso de maduración en el tiempo que dura el proceso de exportación.

4. Para la inducción de las proteínas de choque térmico en los frutos estos son expuestos a una temperatura de 38-40°C por 30-240 minutos confiriéndoles de esta manera Termotolerancia cuando son almacenados a bajas temperaturas disminuyendo así la susceptibilidad al daño por frío.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.
- 2.-Armstrong, J.W. 1992. Fruit fly disinfestation strategys beyond methyl bromide. *New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science*. Chapter 20 Pág. 181-193.
- 3.-Apelbaum, A. Zauberman, G. and Fuchs, Y. 1997. Prolonging storage life of avocado fruits bysubatmos pheric pressure. *Hort Science* 12(2):115-117.
- 4.-ASEEAM (Asociación de Exportadores y Empacadores de Aguacate Mexicano A.C.). El aguacate mexicano. Boletín interno. Sin ficha.
- 5.-Biggs, M.S. Woodson W.R y Handa, A.K., 1998. Biochemical basis of high-temperature inhibition of ethylene biosynthesis in ripening tomato fruit. *Physiol plant*. Chapter 72. Pág. 572-578.
- 6.-Cantwell M. 1999. Sitio de Internet de la Universidad Michoacana en Davis con información recopilada por la Dra. Marita Cantwell sobre las propiedades y condiciones recomendadas para el almacenamiento de frutos y vegetales frescos.
- 7.-Cappellini, R. A. Ceponis M. J. And lightner G. W. 1988. Disorders in avocado, mango and pineapple shipments to the New York market 1972-1985. *Plant Disease* 72(3):270-273.
- 8.-Ellis, R.J. 1994. Opening and closing the Anfinsen cage. *Curr. Biol.* 4, 633-635.
- 9.-Ellis, R.J., and Hartl, F.U. 1999. Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 102-110.
- 10.-Ellis, R. J. THE CHAPERONINS Academic Press, 1996. GROEL-MEDIATED PROTEIN FOLDING. W. A. Fenton y A. L. Horwich en *Protein Science*, Vol. 6, Pág. 743-760.
- 11.-Florissen, P., Ekman J. S., Blumenthal C., Mc Glasson W. B., Conroy J., Holford P. 1996. The effects of Short heat-treatments on the induction of chilling injury in avocado fruit (*Persea Americana Mill*). *Postharvest Biol. & Technol* 8(2):129-141.
- 12.-Kadder, A. A. and Barret D. M. 1996. Classification, composition of fruits and postharvest maintenance of quality. Processing fruits: Chapter 1. In *Science and technology. Biology principles and applications* Vol. 1. Somogyi L. P. Ramaswamy H. S. And Huit Y. H. (Eds). Technomic publication. Pp. 1-24.
- 13.-Kader, A. A. 2002. Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha. *Postharvest Technology*.
- 14.-Kays, S.J 1991. *Postharvest Physiology of perishable plant products*. Editorial Avi. Pág.339, 457-462, 505.

- 15.-Kitinoja Lisa y Kader A. Adel 1996. Series de Horticultura Postcosecha No.85 Departamento de pomología. Universidad de California Davis, California 1995.
- 16.-Lee, S.K. and Young R.E. 1984. Temperature sensitivity of avocados fruit in relation to C₂H₄ treatment. J. Amer. Soc. Hort: Sci. 109(5):395-397.
- 17.-López Lagunas E. 2004. Efecto del Choque térmico sobre el contenido de ácidos grasos y la calidad microbiológica del aguacate C.V Hass. Tesis de Licenciatura. UMSNH. Escuela de Químico Farmacobiología.
- 18.-Lurie, S. 1948. Postharvest heat treatments. Postharvest Biol & Technol. Chapter 14 Pág. 257-269.
- 19.-McCallum T.G. Daquino, S. y McDonald, R.E. 1993. Heat treatment inhibits chilling injury. Hort Science. Chapter 28. Pág. 197-198.
- 20.-Morales, G. L. 1999. Cuidados del Aguacate en precosecha. Boletín interno de la Asociación Avícola local de productores de aguacate de Uruapan Michoacán (APROAM).
- 21.-Nogalimgam, T.1993. Avocado. In Enciclopedia of food science and nutricion. Macrae R. Robinson R.K. and Sadler M. J. (Eds). Academic Press, London. Pág. 293.
- 22.-Schoffl, F. Prandl R. and Reindl A. 1998. Regulation of the heat-shock response. Plant Physiol. 117:1135-1141.
- 23.-Uritani, I. 1978. Temperature stress in edible plant tissues after harvest. Chapter 6. In Postharvest biology and biotechnology. Hultin H. O. and Milner M, (Eds) Food & Nutrition Press Inc. Pp. 136-160.
- 24.-Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants . Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:579-620.
- 25.-Woolf, A. B. and Lee L. 1997 Pretreatment at 38°C for Hass avocado confers thermotolerance to 50°C hot water treatments. Hort Science 32(4):147-151.
- 26.-Woolf, A. B. Watkins C. B., Bowen J. H. Lay-Yee M., Maindonald J. H. and Ferguson I. B. 1995. Reducing external chilling injury in stored Hass avocados with dry heat treatments. J. Amer. Soc Hort. Sci. 120(6): 1050-1056.
- 27.-Yaid, K. E. M. y Baez S. R. 1992. Manejo postcosecha de frutas subtropicales. En Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas. Yahia K. E. M. e Higuera C. I. (Eds). Limusa. Pp.197-205.
- 28.-Zauderman, G. Schiffman-Nadel M. and Yanko U. 1973. Susceptibility to chilling injury of three avocado cultivars at various stages of ripening. Hort Science 8(6):511-516.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

29.-“Científicos granadinos”

Fuente. <http://www.andaluciajunta.es>

Acceso Junio 2005.

30.-“Las Chaperoninas: Máquinas plegadoras de proteínas”.

Fuente. <http://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen4/numero2/articulos/articulo1.html>

Acceso Junio 2005

31.-Balestra, C. ¿Una pastilla para los buceadores?

Fuente. <https://www.daneurope.org/esp/report1.htm> - 12k –

Acceso Noviembre 2005.

32.-“Daño por frío”

Fuente. <http://www.ecoplant.cl/nelads.html>.

Acceso Octubre 2005.

33.-Fuente. <http://www.el mundo.es/salud/2000/390/959927999.html>.

Acceso Octubre 2005

34.-Barreto A.1, Barrera G.2, y Gonzáles J.M. y Florentino S1. Revisión de Temas. Regulación de la localización de las proteínas de choque térmico (HSP70s) por citocinas en la línea tumoral K 562”. Fuente.

<http://www.encolombia.com/medicina/alergia/alergia11102relacionentrelainfección.htm>

Acceso Octubre 2005

35.-“Chirimoyo”.

Fuente. <http://es.news.yahoo.com/051017/4/4cdcr.html>

Acceso Noviembre 2005

36.- De Wikipedia, la Enciclopedia libre. “Proteína de Choque Térmico”.

Fuente. http://es.wikipedia.org/wiki/Prote%C3%ADnas_de_choque_t%C3%A9rmico.

Acceso Agosto 2005.

37.-“Manual de Practicas de manejo pots cosecha”.

Fuente. <https://www.fao.org/Wairdocs/x54035/x5403s09.htm>

Acceso Noviembre 2005.

38.-“Daño por frío”.

Fuente. <http://www.fmedia.unr.edu.ar/catedras/inmunologia/inmuno/innata-7.htm>

Acceso Octubre 2005.

39.- Rojas W. “Proteínas de estrés”.

Fuente. <http://www.iladiba.com.co/revista/1995/05/avcieb.asp>

Acceso Septiembre 2005.

40.-“El cultivo de chirimoyo”

Fuente. http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/chirimoyo.htm

Acceso Noviembre 2005.

41.-“El Cultivo de la Piña”.

Fuente. http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/pina.htm
Acceso Noviembre 2005.

42.-Mangione J. L. “Enfermedades y alteraciones postcosecha en banana”.

Fuente.
www.mercadocentral.com.ar/.../ENFERMEDADES%20%20Y%20ALTERACIONES%20P%20OSCOSECHA%20EN%20
Acceso Noviembre 2005.

43.-“Termotolerancia adquirido y expresión del HSP/100 ClpB de Genes de Lima Bean.

Fuente. <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/123/3/1121>
Acceso Noviembre 2004

44.-“Comparaciones de la Secuencia de la Proteína 60 del choqué térmico: Duplicaciones, transferencia lateral, y evolución de la Mitocondria”.

Fuente. <http://www.pnas.org/cgi/content/full/97/21/11348>
Acceso Noviembre 2004

45.- Trevor V. Suslow y Marita Cantwell. “Calabacita (zapallo de verano)”.

Recomendaciones para mantener la Calidad Postcosecha.
Fuente. <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/calabacita.shtml>
Acceso Noviembre 2005

46.- Trevor V. Suslow y Marita Cantwell. “Indicadores básicos del Manejo Postcosecha en Pepino”.

Fuente. <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Pepino.shtml-15k>
Acceso Noviembre 2005.

47.- Trevor V. Suslow y Marita Cantwell. “Tomate: (Jitomate)”.

Fuente. <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Tomate.shtml>
Acceso Noviembre 2005.

48.-Cortés P.C.J. “Los Tratamientos térmicos le dan una mayor vida al fruto.

Fuente. <http://www.producemich.orgmx/editorial/Numero3/11.htm>
Acceso Septiembre 2005.

49.-Guzmán L. B. A “Tomate”. Fuente.

http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_biosfera/flora/tomate/tomate.htm. Acceso Noviembre 2005.

50.-”Efecto del tratamiento de inmersión en agua caliente sobre el desarrollo de daños por el frío en frutos de mango (*Mangifera indica* L.).

Fuente. http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v49_1/a491a006.html
Acceso Noviembre 2005.

51.-CSIC BIO55-“Procedimiento para la inactivación reversible por calor, e in vivo, de proteínas con actividad biológica”. Fuente.

<http://www.serina.es/escaparate/verproducto.cgi?idproducto=2604&refcompra=NULO>
Acceso Octubre 2005.

52.-Kader, A. "Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha de banano".

Fuente. <http://www.sica.gov.ec/cadenas/banano/docs/banano-postcosecha.htm>

Acceso Noviembre 2005.

53.-"Proteínas del choque térmico".

Fuente. <http://www.siicsalud.com/dato/dato039/04802028.htm>

Acceso Octubre 2005.

54.-Heredia, N. L. "Efecto del DMPS sobre la respuesta al estrés celular inducida por Mercurio y Arsénico en cultivos de células de OK", "Metabolitos excretados por células de *Clostridium perfringens* con capacidad termoprotectora".

Fuente. <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/especiales/memorias-atam/05.htm>

Acceso Agosto 2005.

55.-Fuente. http://www.uc.cl/sw_educ/agronomia/desorden_fruta/html

Acceso Octubre 2005.

56.-Valpuesta J.M, Llorca O. y Marco S. "Biología de las Chaperoninas". Fuente.

http://www.ucm.es/info/antilia/asignatura/practicas/trabajos_ciencia/caperoninas.htm

Acceso Junio 2005.

57.-"Respuesta al Choque Térmico" y "El calor induce la expresión de proteínas".

Fuente. http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/15regulacion.htm#_Toc62377255

Acceso Noviembre 2005.

58.-"Factores que afectan la Estabilidad Estructural de las Proteínas". Fuente.

http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000024/lecciones/cap01/01_01_15.htm

Acceso Noviembre 2005.

59.-"Síntesis de proteínas".

Fuente. <http://www.monografias.com/trabajos/sinteproteinas/sinteproteinas.shtml>

Acceso Diciembre 2005.