

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"
Centro de Investigaciones Biomédicas

RELACIONES DEL ESTRÉS OXIDATIVO CON EL CATABOLISMO DE PROTEÍNAS

Dr. Agustín Vicedo Tomey y Lic. Yoryana Vicedo Ortega

RESUMEN

En la actualidad comienzan a emerger evidencias de que las relaciones entre los radicales libres, las proteínas y los mecanismos de proteólisis son mucho más complejas de lo que inicialmente se pensó. Hoy día diversas proteínas son consideradas no sólo como blanco de la acción de los radicales libres sino que pueden comportarse como generadoras y propagadoras de estas dañinas sustancias. De igual forma, los efectos del estrés oxidativo no sólo modifican las propiedades de las proteínas consideradas como sustratos de los mecanismos de proteólisis, sino que pueden afectar los mecanismos proteolíticos propiamente dichos, incluidas las vías lisosomal, proteosomal y de las calpaínas en el catabolismo proteico intracelular. En este trabajo se propuso una visión holística e integradora de estas alternativas, se pretendió considerar toda la variada gama de posibilidades de interacción que podía producirse en el triángulo radicales libres -proteínas- proteólisis. Este esquema puede resultar de gran utilidad metodológica al analizar los resultados experimentales en este terreno, así como al abordar su interpretación.

Descriptor DeCS: ESTRES OXIDATIVO; RADICALES LIBRES; CALPAINA; ENVEJECIMIENTO CELULAR.

Se ha demostrado la capacidad de los radicales libres de reaccionar con lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. El daño oxidativo a las proteínas tiene una química muy compleja. Sistemas generadores de radicales libres como el compuesto por Cl_2Fe /ácido ascórbico, el de xantina / xantina oxidasa y el H_2O_2 , producen la aparición de numerosos grupos carbonilo y otras alteraciones en diferentes proteínas. Los mecanismos operantes en cada sistema pudieran ser diferentes y también pueden variar

en dependencia de la proteína afectada. El daño oxidativo de las proteínas tiene vínculos con el que se produce en otras biomoléculas.

Se ha planteado un esquema de las posibles consecuencias del estrés oxidativo sobre el catabolismo de proteínas. Las evidencias de este tipo provienen tanto de estudios del estado del catabolismo de proteínas en situaciones fisiopatológicas donde la participación de los radicales libres es generalmente aceptada, como de demostra-

ciones directas de la relación entre radicales libres y alteraciones de la proteólisis. Estas alteraciones de la proteólisis por los radicales libres se manifiestan tanto en el catabolismo intracelular de proteínas como en sistemas extracelulares, en especial en las proteínas de la matriz intercelular. Por otra parte, algunas proteínas pueden comportarse como generadoras y propagadoras de radicales libres, como en el caso de la mioglobina y la peroxidasa que generan radicales libres en presencia de H_2O_2 .

Las proteínas alteradas, posiblemente por un incremento de su hidrofobicidad, son más rápido ubiquitinizadas y degradadas por la vía proteosomal. En estos mecanismos degradativos pueden también participar el sistema lisosomal y las proteinasas dependientes de calcio (calpaínas). En ciertas condiciones pueden producirse dificultades para el catabolismo de las proteínas modificadas con acumulación de productos de difícil degradación.

La relación entre radicales libres, proteínas y proteólisis se muestra extraordinariamente compleja, pues si algunas proteínas pueden actuar como generadoras y propagadoras de radicales libres, también su estructura puede sufrir diversas modificaciones por acción de dichos radicales, lo que alteraría su catabolismo. Estas alteraciones pudieran formar parte de los mecanismos de daño que se observan en el envejecimiento, la isquemia -reperfusión, la producción de cataratas y otras situaciones.

Hasta hace poco se consideraba que en las células existían 2 vías fundamentales para el catabolismo de proteínas, la llamada vía lisosomal y la vía no lisosomal. La vía lisosomal depende de la presencia en estos organelos de diversas enzimas proteolíticas denominadas genéricamente catepsinas. Por su parte la vía no lisosomal depende de complejos macromoleculares nombrados proteosomas, los que poseen una

actividad proteolítica variada. Esta vía proteosomal requiere ATP para su funcionamiento y su selectividad está determinada por los procesos de ubiquitinización de las proteínas sustrato. A estos 2 procesos debe añadirse el sistema proteolítico celular dependiente de calcio y que está representado por las enzimas denominadas calpaínas.¹

La selectividad por las proteínas sustrato parece ser uno de los atributos más destacados de la vía proteolítica de los proteosomas. Sin embargo la determinación de las proteínas que serán degradadas por esta vía ocurre con anterioridad a los eventos proteolíticos propiamente dichos. Algunas características intrínsecas de la proteína sustrato, incluidas ciertas secuencias aminoacídicas hacen a las proteínas más susceptibles al marcaje por ubiquitina y su posterior degradación. En el proceso de unión de la ubiquitina a las proteínas sustrato participa un conjunto de enzimas denominadas E1, E2, E3 y E4.^{2,3} Las proteínas alteradas, posiblemente por un incremento de su hidrofobicidad, son más rápido ubiquitinizadas y degradadas por la vía proteosomal.

EFFECTOS DE LA AGRESIÓN OXIDATIVA SOBRE LAS PROTEÍNAS

Se ha demostrado la capacidad de los radicales libres de reaccionar con lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. El daño oxidativo a las proteínas tiene una química muy compleja.⁴ Entre las especies más deletéreas se incluyen radicales de propagación como el alcoxilo. A partir de las proteínas agredidas se generan algunos productos como los hidroperóxidos proteicos que son relativamente estables y pueden generar nuevos radicales al reaccionar con metales de transición.

Los residuos de aminoácidos azufrados, así como los de lisina e histidina suelen ser muy susceptibles al daño oxidativo. En los primeros se generan disulfuros que pueden ocasionar el establecimiento de puentes covalentes cruzados entre proteínas o subunidades con formación de agregados. En los segundos se produce su oxidación a grupos aldehídos lo cual también puede ocurrir con residuos de aspártico, prolina y arginina, esto da lugar a un incremento de grupos carbonilo en las proteínas agredidas.⁵ En los casos extremos llega a producirse incluso la fragmentación de las cadenas polipeptídicas.⁶

Diferentes sistemas han demostrado capacidad de producir daño oxidativo *in vitro*.⁷ Se ha observado que el 4 hidroxil 2 nonenal, un producto final de la peroxidación lipídica se une covalentemente a diversas proteínas. Las proteínas modificadas por la unión del nonenal muestran gran susceptibilidad a la ubiquitinización. Estos cambios se han podido demostrar en sistemas *in vivo* donde se ha producido el estrés oxidativo en riñones de animales de experimentación mediante la inyección intraperitoneal de nitrito acetato férrico.⁸

Por otra parte diferentes proteínas son peroxidadas *in vitro* por la acción de radicales hidroxilo generados por radiación. Cuando estas proteínas se incuban con ADN se forman uniones covalentes. La proteólisis ulterior libera el ADN, que no sufre roturas en este proceso. Se considera que este pudiera ser uno de los mecanismos del daño celular que ocasionan los radicales libres a la célula.⁹

En términos generales la modificación oxidativa de las proteínas incrementa su degradabilidad y susceptibilidad a la proteólisis, posiblemente por el incremento de su hidrofobicidad.^{5,10} Sin embargo, es necesario considerar que determinados tipos de modificaciones pudieran incrementar la resistencia a la proteólisis, lo que conduciría a la acumulación de estas proteínas alteradas dentro de la célula.⁴

EVIDENCIAS CONTINGENCIALES DE LA RELACIÓN FISIOPATOLÓGICA ENTRE ESTRÉS OXIDATIVO Y CATABOLISMO PROTEICO

En diversos tipos de células envejecidas (eritrocitos, fibroblastos, células lenticulares y otras) se encuentra un incremento de los grupos carbonilo de las proteínas, lo que pudiera ser un reflejo de la agresión oxidativa sobre estas biomoléculas.⁵ Esto debe traducirse en un incremento de su degradabilidad, de modo que su acumulación con el envejecimiento pudiera estar reflejando un aumento de su producción, la disminución de factores protectores o una disminución de su degradación, o bien, combinaciones de estos factores.

En las heridas en proceso de cicatrización se ha observado que el envejecimiento determina una disminución de los inhibidores 1 y 2 de *metaloproteinasas de la matriz* (MMPs). Se ha planteado que el daño oxidativo de estos inhibidores de naturaleza proteica condicionaría su pérdida de actividad, con el consecuente incremento de la actividad proteolítica de las metaloproteinasas y el entorpecimiento de los procesos de cicatrización.¹¹

El envejecimiento se ha asociado con un incremento de proteínas ubiquitinizadas y aumento de las actividades de las enzimas E1 y E2 pero con una disminución global del catabolismo proteico. Resulta interesante que la restricción calórica, cuyo efecto enlentecedor del envejecimiento está demostrado, evita estos cambios incrementando la intensidad del catabolismo proteico por la vía ubiquitina-proteosomas.^{12,13}

En cristalinopacificados se ha encontrado una disminución de la actividad quimotríptica de los proteosomas, esta pudiera ser la causa de acumulación de proteínas alteradas que se produce con la edad en el cristalino.¹⁴ Por otra parte, en ratas que presentan cataratas hereditarias se ha encontrado un incremento en la proteólisis de algunas proteínas del cristalino. Esto se

ha vinculado con el hecho de que con la edad aumenta el calcio intracelular y esto conduciría a una activación del sistema de las calpaínas.^{15,16}

En el corazón, durante isquemia reperfusion, se ha encontrado un incremento de la proteolisis de miofibrillas mediado por calpaínas. Se plantea que los radicales libres pudieran ocasionar una sobrecarga de calcio y con ello la activación del sistema de las calpaínas.¹⁷

En el caso del cerebro la isquemia reperfusion produce un incremento en el catabolismo de alfa fodrina. Como los inhibidores de calpaína previenen esta degradación se considera que en este tejido operaría un mecanismo similar al planteado para el corazón.¹⁸

Otras evidencias contingenciales se han obtenido en otros modelos como el del ejercicio que produce un incremento en la actividad de calpaína muscular¹⁹ y en la intoxicación por metanol que se acompaña de la formación de radicales libres y en la cual se ha encontrado en el hígado un incremento en el número de lisosomas, así como presencia aumentada de catépsina D liberada al citosol.²⁰

EVIDENCIAS DIRECTAS DE LA RELACIÓN ENTRE RADICALES LIBRES Y ALTERACIONES DE LA PROTEOLISIS

Se ha podido observar que los radicales libres incrementan la proteolisis en eritrocitos. Se ha calculado que se produce un nuevo grupo amino por cada radical libre introducido en el sistema.²¹

En la pancreatitis aguda inducida por ceruleína se observa un incremento de los grupos carbonilo de las proteínas y eso refleja su daño peroxidativo. Este incremento regresa a la normalidad al cabo de varias horas lo que indica una proteolisis incrementada de estas proteínas alteradas y refuerza la consideración de los sistemas

proteolíticos como mecanismos de "limpieza".²²

Se ha podido constatar que en los procesos donde ocurre activación de polimorfonucleares, estos liberan radicales. Estos radicales libres interactúan con el dominio autoinhibitorio de las *prometaloproteinasas de la matriz*, convirtiéndolas a su forma activa. Las especies reactivas del oxígeno también inactivan al inhibidor $\alpha 1$ de proteinasas. Todo ello incrementa el daño proteolítico que sufre la matriz intercelular en estas situaciones.²³

Las proteínas de la matriz del sarcoma cuando son incubadas en un medio donde se generan radicales libres, estimulan la proteolisis y dan lugar a fragmentos proteicos, algunos de los cuales son solubles pero en otros se producen puentes cruzados y formación de agregados.²⁴

Un modelo muy estudiado y completo es el de los linfocitos infectados con VIH.²⁵ Cuando estas células son activadas se produce un incremento notable en la concentración de especies reactivas del oxígeno en especial del anión superóxido. Casi simultáneamente se detecta un incremento en la expresión de superóxido dismutasa que de forma paradójica, presenta una actividad específica disminuida. Hay una marcada elevación de los grupos carbonilo en las proteínas celulares y un catabolismo acelerado y generalizado que se sospecha se produzca mediante los proteosomas. Todos estos cambios pudieran estar relacionados con el desencadenamiento de la apoptosis que se observa en los linfocitos infectados con VIH.

OTROS MECANISMOS DE VÍNCULOS ENTRE LOS RADICALES LIBRES, LAS PROTEÍNAS Y LA PROTEOLISIS

Las relaciones entre los radicales libres, las proteínas y la proteolisis parecen ser múltiples y complejas. Algunas proteínas pueden comportarse como generadoras

de radicales libres. La mioglobina y la peroxidasa generan radicales libres en presencia de H_2O_2 . Está documentada también la transferencia de grupos radicales de unas proteínas a otras.²⁶ La triptofano hidroxilasa cerebral genera radicales libres mediante la reacción de Fenton con el hierro, y produce radicales hidroxilo en su sitio activo los cuales llegan a destruir la propia molécula enzimática.²⁷

Se considera, por otra parte, que la acumulación de dolicol que se observa en el envejecimiento produce una mayor sensibilidad de las membranas al estrés oxidativo y condiciona una disminución de la actividad autofágica celular la cual es revertida por la restricción calórica.²⁸

En cuanto al sistema de la ubiquitina proteosomas se plantea que su actividad sobre proteínas específicas se incrementa en cualquier circunstancia en que resulta necesario reparar daños celulares, como los que se producen por los radicales libres.²⁹ Sin embargo, otros autores declaran haber encontrado disminuciones transitorias de la actividad de los proteosomas durante el estrés oxidativo y lo fundamentan a través de la unión del nonenal, producto de la peroxidación lipídica a las propias subunidades proteicas de los proteosomas.

Si bien la unión del nonenal a las proteínas sustratos incrementaría su ingreso a la vía de la ubiquitina, los efectos directos sobre el proteosoma impedirían su procesamiento proteolítico y darían lugar a su acumulación.⁸

En el sistema de las calpaínas se ha visto que el estrés oxidativo pudiera incrementar su actividad, pero hay experimentos en los cuales los radicales libres impiden la activación de las calpaínas que se induce por ionóforos de calcio.³⁰

Otro mecanismo de interacción es el que se plantea en cuanto a los efectos de la proteólisis parcial de las proteínas del cristalino y su consecuente agregación. Los agregados producirían una barrera impidiendo la acción de los antioxidantes solubles, estos no podrían contrarrestar la acción perjudicial de los singletes de oxígeno.³¹

Resulta evidente que las interacciones en el sistema proteínas – radicales libres – proteólisis son sumamente complejas e implican las afectaciones a los sustratos potenciales, la de los sistemas proteolíticos y sus inhibidores así como a los diferentes mecanismos de regulación implicados. Por todo ello, cada modelo experimental deberá ser interpretado en su singularidad pero teniendo en cuenta las posibles alternativas de interacción que se han reseñado.

SUMMARY

Nowadays, there are evidences that make us know that the relations among the free radicals, the proteins and the mechanisms of proteolysis are much more complex than what was initially thought. Today, different proteins are considered not only as the target of the action of the free radicals, but they can also behave themselves as generators and propagators of these harmful substances. Likewise, the effects of oxidative stress not only modify the properties of the proteins considered as substrates of the mechanisms of proteolysis, but they can affect the proteolytic mechanisms as such, including the lysosomal and proteosomal pathways and those of the calpains in the intracellular protein catabolism. In this paper it was proposed an integrating view of these alternatives and it was pretended to consider all the varied range of possibilities of interaction that may occur in the free radicals - proteins - proteolysis triangle. This scheme may be very useful from the methodological point of view on analyzing the experimental results attained in this field, as well as on approaching their interpretation.

Subject headings: OXIDATIVE STRESS; FREE RADICALS; CALPAIN; CELL AGING.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schields DC, Banik NL. Putative role of calpain in the pathophysiology of experimental optic neuritis. *Exp Eye Res* 1998;67(4):403-10.
2. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 1999;96(5):635-44.
3. Perry WL, Hustad CM, Swing DA. The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a 18H mice. *Nat Gen* 1998;18(2):143-6.
4. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MG. Biochemistry and Pathology of radicals - mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997;324:1-18.
5. Gracy RW. Effects of aging on proteins. *Molecular Aging, Cytogerontology, and Wound Haling Units*. Chapter 4. 1992:119-45.
6. Grune T, David KJ. Breakdown of oxidized proteins as a part of secondary antioxidant defenses in mammalian cells. *Biofactors* 1997;6(2):165-72.
7. Kocic G, Vlahovic P, Pavlovic D, Kocic R. The possible importance of the cation-binding site for the oxidative modification of liver 5-nucleotidase. *Arch Physiol Biochem* 1998;106(2):91-9.
8. Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T, Toyokuni S. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules. *J Biol Chem* 1999;274(34):23787-93.
9. Gebicki S, Gebicki JM. Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides. *Biochem J* 1999;38(pt 3):629-36.
10. Skrzydlewska E, Farbiszewski R, Gacko M. The effect of protein oxidation modification on protease-antiprotease balance and intracellular proteolysis. *Postepy Hig Med Dosw* 1997;51(4):443-56.
11. Ashcroft GS, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Horan MA. Human ageing impairs injury-induced in vivo expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and-2 proteins and mRNA. *Pathology* 1997;183(2):169-76.
12. Vittorini S, Paradiso C, Donati A, Cavallini G. The age-related accumulation of protein carbonyl in rat liver correlates with the age-related decline in liver proteolytic activities. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999;54(8):318-23.
13. Scrofano MM, Shang F, Nowell TR Jr, Gong X. Aging, calorie restriction and ubiquitin-dependent proteolysis in the livers of Emory mice. *Mech Ageing Dev* 1998;101(3):277-96.
14. Andersson M, Sjostrand J, Karisson J. Proteolytic cleavage of N-Succ-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC by the Proteasome in lens epithelium from clear and cataractous human lenses. *Exp Eye Res* 1998;67(2):231-6.
15. Inomata M, Nomura K, Takehana M, Saido TC. Evidence for the involvement of calpain in cataractogenesis in Shumiya cataract rat (SCR). *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362(1):11-23.
16. Gong X, Li E, Klier G, Huang Q, Wu Y. Disruption of alpha 3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell* 1997;91(6):833-43.
17. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999;79(2):609-34.
18. Fukuda S, Harada K, Kunimatsu M, Sakabe T. Postischemic reperfusion induces alpha-fodrin proteolysis by m-calpain in the synaptosome and nucleus in rat brain. *J Neurochem* 1998;70(6):2526-32.
19. Raj DA, Booker TS, Belcastro AN. Striated muscle calcium-stimulated cysteine protease (calpain-like) activity promotes myeloperoxidase activity with exercise. *Pflugers Arch* 1998;435(6):804-9.
20. Skrzydlewska E, Szynaka B. Ultrastructural evaluation of lysosomes and biochemical changes in cathepsin D distribution in hepatocytes in methanol intoxication. *Rocz Akad Med Bialymst* 1997;42 Suppl 2:47-55.
21. Celedon G, Lips V, Alvarado C, Cortes M, Lissi EA. Protein degradation in red cells exposed to 2,2'-azobis(2-amidinopropane) derived radicals. *Biochem Mol Biol Int* 1997;43(5):1121-7.
22. Sledzinski Z, Antosiewicz J, Wozniak M, Ostrowski MM. Modification of proteins in the course of oxidative stress in acute experimental pancreatitis. *Wiad Lek* 1997; 50 Supp 1 Pt 2:115-8.
23. Maeda H, Okamoto T, Akaike T. Human matrix metalloproteinase activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol Chem* 1998;379(2):193-200.
24. Riedle B, Kerjaschki D. Reactive oxygen species cause direct damage of Engelbreth-Hom-Swarm matrix. *Am J Pathology* 1997;151(1):215-31.

25. Piedimonte G, Guetard D, Magnanim Corsi D, Picerno I. Oxidative protein damage and degradation in lympho-cytes from patients infected with Human Immunodeficiency Virus. *J Infectious Diseases* 1997;176:655-64.
26. Ostdal H, Andersen HJ, Davies MJ. Formation of long-lived radicals on proteins by radical transfer from heme enzymes-a common process? *Arch Biochem Biophys* 1999;362(1):105-12.
27. Cash CD. Why tryptophan hydroxylase is difficult to purify: a reactive oxygen-derived species-mediated phenomenon that may be implicated in human pathology. *Gen Pharmacol* 1998;30(4):569-74.
28. Marino M, Dolfi C, Paradiso C, Cavallini G. Age-dependent accumulation of dolichol in rat liver: is tissue dolichol a biomarker of aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998;53(2):87-93.
29. Wilkinson KD. Roles of ubiquitinylation in proteolysis and cellular regulation. *Annu Rev Nutr* 1995;15:161-89.
30. Guttman RP, Johnson GV. Oxidative stress inhibits calpain activity in situ. *J Biol Chem* 1998;273(21):13331-8.
31. Linetsky M, Ranson N, Ortwerth BJ. The aggregation in human lens proteins blocks the scavenging of UVA-generated singlet oxygen by ascorbic acid and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1998;351(2):180-8.

Recibido: 3 de abril del 2000. Aprobado 27 de junio del 2000.

Dr. *Agustín Vicedo Tóme*y. Centro de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Avenida 146 No. 3102 esquina a 31, reparto Cubanacán, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 11600.