

vo de vibraciones en los cables de puentes colgantes. Probablemente no hay estudiante universitario de Física que no haya visto la filmación del hundimiento del puente colgante de Tacoma Narrow debido a las vibraciones inducidas por un fuerte vendaval. Hoy en día esta posibilidad se evita de forma efectiva por medio de la instalación de amortiguadores activos en los cables del puente.

Finalmente, en *Bio-ingeniería* se están usando ya amortiguadores activos para aumentar el confort de marcha en prótesis artificiales de rodilla. Otra vía, aún en estado de estudio preliminar es la de utilizar materiales compuestos, en los que el fluido soporte se sustituye por

un gel elástico, como “músculos artificiales”.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R.G. Larson, *The Structure and Rheology of Complex Fluids*, Oxford University Press, Nueva York, 1999.
- [2] G. Strobl, *The Physics of Polymers*, Springer, Berlin, 1997.
- [3] W.B. Russel, D.A. Saville y W.R. Schowalter, *Colloidal Dispersions*, Cambridge University Press, 1989.
- [4] R.E. Rosensweig, *Ferrohydrodynamics*, Dover Publications, Nueva York, 1985.
- [5] E. Riande, R. Díaz-Calleja, M.G. Prolongo, R.M. Masegosa y C.Salom, *Polymer Viscoelasticity*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.

- [6] S. Melle, *Estudio de la dinámica en suspensiones magneto-reológicas sometidas a campos externos mediante el uso de técnicas ópticas: Procesos de agregación, formación de estructuras y su evolución espacio-temporal*; Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNED, 2002.

- [7] Lord Corporation, Cary, North Carolina, E.E.U.U. URL:

<http://www.lordcorp.com/>

<http://www.cadillac.com/cadillacjsp/models/gallery.jsp?model=srx>

Miguel Ángel Rubio Álvarez

Dpto. de Física Fundamental (UNED)

Sonia Melle y Pablo Domínguez

Dpto. de Óptica, Fac. de Física (UCM)

COLABORACIONES

Las proteínas de estrés. La respuesta de las células a los cambios ambientales

Una de las características más llamativas de los seres vivos es su habilidad para detectar los cambios en el medio ambiente y adecuarse continuamente a las nuevas situaciones; de ella dependen la supervivencia de los individuos y la evolución de las poblaciones. También las células, tanto de vida libre como las que componen un organismo pluricelular, son capaces de adaptarse a los cambios en las condiciones ambientales. Existe un complejo entramado de sensores y mecanismos de transducción de señales que logran un continuo ajuste del crecimiento, la proliferación, la expresión de los genes y las actividades metabólicas de la célula a pequeñas y graduales variaciones en su entorno. Pero en determinadas ocasiones las células se enfrentan a unas condiciones ambientales demasiado adversas, que pueden ser críticas y llegar a poner en peligro su propia supervivencia. Entonces decimos que la célula se encuentra en una situación de estrés. Hoy sabemos

que ante estas situaciones se activa un mecanismo defensivo que afecta a la propia expresión del genoma.

La palabra *estrés* se ha convertido en un comodín de nuestro vocabulario ya que constituye una experiencia casi cotidiana en nuestro estilo de vida actual. Pero ¿qué es exactamente el estrés para una célula? Resulta difícil dar una definición precisa, ya que, al igual que en los humanos, la percepción de una situación de estrés es totalmente dependiente del tipo de célula. En términos generales, se trata de un cambio brusco y repentino en algún parámetro ambiental, que puede ser de naturaleza física o química (temperatura, presión, radiación, concentración de sales, pH, presencia de metales pesados, sustancias tóxicas, etc.), de manera que se aleje de las condiciones habituales fisiológicas y que puede provocar daños en algunos de los componentes de la célula, sin llegar a alcanzar una situación claramente letal para la misma. Puesto que las condiciones “norma-

les” difieren según el tipo de célula, lo mismo ocurre con las condiciones que perciben como anormales. Por ejemplo, una temperatura de 37°C es normal para una célula de mamífero, pero solo dos o tres grados más, a partir de 40°C empieza a ser crítica y se activa la respuesta de estrés, mientras 37°C resulta muy comprometida para las células de un organismo acuático que normalmente se encuentran entre 15°C y 25°C.

No obstante, aunque en la percepción del estrés hay diferencias entre las células podemos decir que todas ellas responden de una forma muy parecida ante situaciones estresantes muy diversas. Por eso hoy día podemos hablar de la “**respuesta celular al estrés**” en términos genéricos, ya que hay unos elementos clave que la caracterizan. Implica una reprogramación rápida del genoma, de manera que se activa un pequeño grupo de genes que codifican las denominadas proteínas de estrés, cuya síntesis es muy rápida y muy eficiente, incluso en condiciones en que toda la maquinaria celular está en una situación crítica. Se trata de un mecanismo de defensa y la función

de estas proteínas es protectora ya que ayudan a recuperar los elementos dañados, generalmente otras proteínas y ácidos nucleicos.

UNOS GENES ACTIVADOS POR CALOR

La temperatura es uno de los principales factores de estrés al que se enfrentan todos los organismos, y el mecanismo de respuesta de las células al estrés térmico es sin duda el mejor caracterizado en una amplísima variedad de especies. También fue el primero que se descubrió y, como veremos, es un ejemplo más de cómo un hecho fortuito puede llevar a un descubrimiento de capital importancia.

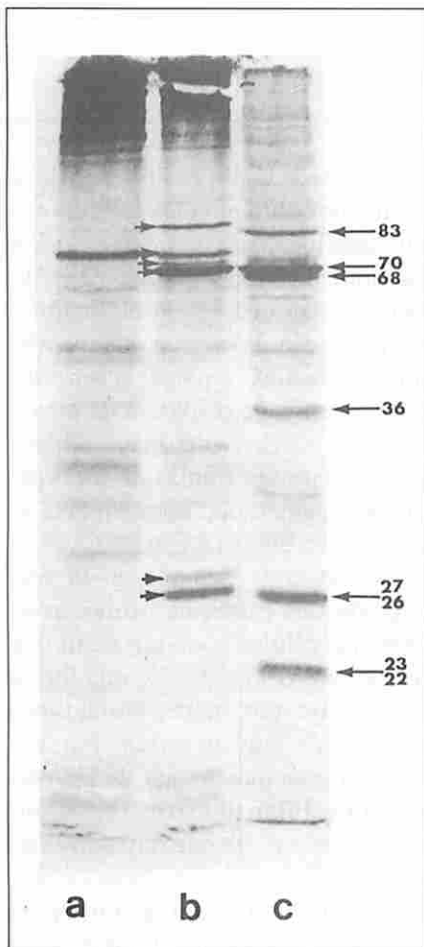


Figura 1. Proteínas de nueva síntesis tras un choque térmico de una hora a 35°C. Para su detección, las células se incuban en un medio con el aminoácido metionina marcado con ³⁵S. Posteriormente, las proteínas se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, y la radiactividad se detecta por autorradiografía. (b) *Chironomus* (c) *Drosophila* (2).

Todo empezó en un pequeño laboratorio de Nápoles y por un error. Alguien había subido la temperatura de 25°C a 37°C en el incubador donde el joven científico Ferruccio Ritossa criaba las moscas en que estudiaba la síntesis de ácidos nucleicos en determinadas regiones o puffs de sus cromosomas gigantes. Observó que en estas condiciones de hipertermia aparecían nuevos puffs, a la vez que se producía prácticamente la represión de los puffs activos en condiciones normales. En 1962, Ritossa publicó que una elevación brusca en la temperatura de cultivo de larvas de *Drosophila*, la mosca de la fruta, pro-

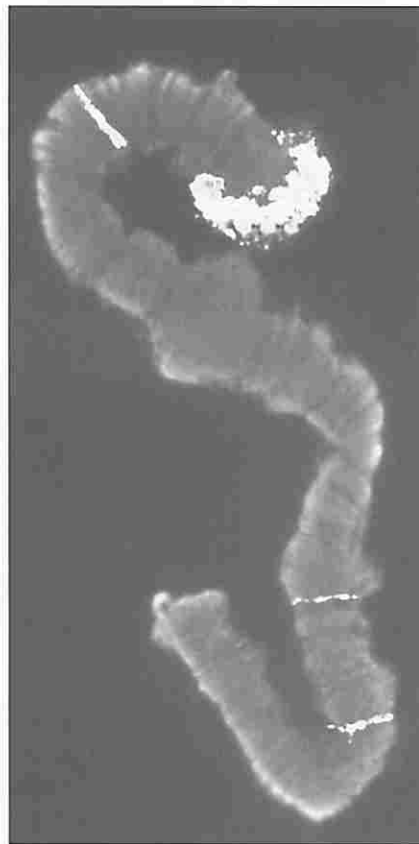


Figura 2. Genes de estrés. Sobre el gris del DNA podemos ver en blanco los genes que se han activado como consecuencia de una subida brusca en la temperatura. La técnica se basa en la detección por inmunofluorescencia de la enzima RNA polimerasa (en los genes activos) con un anticuerpo específico marcado con el fluorocromo Texas Red. El DNA se detecta con la molécula fluorescente DAPI que se intercala en la doble hélice. Dos imágenes compuestas con Adobe Photoshop: fluorescencia a 596nm y a 360nm. Microscopio de fluorescencia Zeiss, cámara CCD Photometrics. Cromosoma politénico del mosquito *Chironomus*. Aumentos 2000x. Autores: Jose Luis Martínez Guitarte y Gloria Morcillo.

vocaba un cambio en el patrón de puffing de los cromosomas politénicos de las células salivales (1). Desde la perspectiva del momento, donde ya se sabía que los puffs eran una manifestación visible de la actividad de determinados genes, pudo concluir que el patrón de expresión génica de las células podía ser dramáticamente alterado por influencias externas. Una serie de tratamientos, como el dinitrofenol, el salicilato sódico y la anoxia, provocaban un efecto sorprendentemente equivalente al choque térmico. Sin embargo, sus trabajos no tuvieron demasiada repercusión ya que parecía un comportamiento muy curioso, pero al fin y al cabo de los genes de una mosca.

A mediados de los años setenta se describe que, además de un efecto directo sobre determinadas regiones de los cromosomas, el choque térmico provoca una alteración rápida y drástica en el patrón de proteínas: mientras que prácticamente cesa la síntesis de las proteínas que normalmente esas células producían se observa la síntesis masiva de unas nuevas proteínas, cuyo número guarda una notable correspondencia con el número de genes inducidos por el calor.

A partir de este momento, el choque térmico adquiere un notable interés, y numerosos grupos de investigación se centran en su estudio en diversos organismos. En pocos años se identifican y aíslan estas proteínas y se establece la correlación precisa entre cada una de ellas y los genes que las codifican. Fueron los primeros genes eucariotas clonados y de los primeros en conocerse su secuencia. Pero aún más importante, al estudiar este fenómeno en multitud de especies diferentes, desde las bacterias hasta las células humanas, se pudo comprobar que todas las células responden frente al estrés térmico de un modo semejante a como lo hacían las células de *Drosophila* (2). Las proteínas están muy conservadas, en cuanto a número y a secuencia de aminoácidos, a lo largo de la escala evolutiva, y, por supuesto, también los genes que las codifican tienen

una elevada homología de secuencia, en algunos de casos mayor del 50% entre las bacterias y los humanos. El solo hecho de su conservación, durante miles de millones de años de evolución, nos habla de un mecanismo básico que debe tener importantes implicaciones para la fisiología de las células. El interés se amplificó a medida que se iban describiendo una amplia variedad de agentes que eran capaces de inducir una respuesta similar a la observada después de un choque térmico.

LAS PROTEÍNAS DE ESTRÉS

Este nombre agrupa a toda una familia de proteínas, cuya síntesis se induce como consecuencia de una situación de estrés, pudiendo llegar a ser masiva, de forma que toda la maquinaria celular de traducción esté prácticamente dedicada a su producción, si las condiciones son críticas o se acercan a la subletalidad. Esto depende de la intensidad y de la duración del agente estresante.

Dado que estas proteínas fueron inicialmente descritas como consecuencia de un estrés térmico, siguen describiéndose como HSPs (Heat-Shock Proteins), independientemente de que otros muchos agentes estresantes induzcan su síntesis. La mayoría de los organismos tienen varias HSPs, que se agrupan en familias conocidas por el nombre de la proteína más representativa del grupo.

HSP100: estas proteínas de estrés de elevado peso molecular, entre 110 y 104 kilodaltons (kDa), son típicas de mamíferos y también aparecen en levaduras, pero no en invertebrados ni en plantas. Normalmente hay dos componentes una HSP110 y una HSP104.

HSP90: en todos los seres vivos se produce una proteína de esta familia como consecuencia de un estrés. En *Drosophila* es una proteína de 83 kDa, en *Chironomus* de 87 kDa, en humanos de 90 kDa, pero se conocen genéricamente como HSP90 (3). Tienen la peculiaridad, con respecto a otras proteínas de

estrés, de que no se induce *de novo* sino que siempre hay una producción basal en condiciones normales, más elevada en determinados estadios del desarrollo embrionario. Esta proteína desempeña un papel muy importante en las rutas de señalización celular ya que se une al receptor de diversas hormonas esteroideas, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos y progesterona.

HSP70: es la más abundante, la más conservada y la más estudiada de todas las HSPs. De hecho es la proteína más conservada a lo largo de la evolución de todas las que se conocen hoy día; entre *Drosophila* y humanos existe más de un 70% de homología de secuencia, que alcanza más del 90% si comparamos determinados dominios funcionales de la proteína. En todos los eucariotas hay distintos representantes de esta familia, por ejemplo existe una HSP70 mitocondrial, y también existen algunos representantes de esta familia multigénica cuya expresión es constitutiva, se conocen como las HSP70c, lo que indica la importancia que para las células tiene la función de estas proteínas (4).

Finalmente, existe otra familia conocida como sHSP (small HSPs) que es la más heterogénea. Comprende a varias proteínas de entre

20 y 30 kDa, por ejemplo en insectos hay 4, pero en plantas hay descritas hasta 15 proteínas dentro de este grupo.

FUNCIÓN DE LAS HSPs EN LAS CÉLULAS

Incluso antes de conocer la función precisa de las HSPs en las células se les adjudicó, obviamente, una función protectora, pero hoy día sabemos que desempeñan un papel activo, ya que la mayoría de las HSPs actúan como *chaperonas* (5). Con este nombre se denominan a las proteínas cuya función es ayudar al plegamiento correcto de otras proteínas. Muchas enzimas y proteínas pierden su conformación nativa y funcional como consecuencia bien de la subida de temperatura o de la presencia de cualquier otro agente de estrés. La función de la mayoría de las HSP consiste en ayudar a replegarse a las proteínas parcialmente desnaturalizadas impidiendo que agreguen de manera irreversible con otras proteínas de la célula. En el caso de no conseguirlo, son secuestradas y desviadas hacia las rutas de degradación, donde otras HSPs actúan como *proteasas*, para que los elementos que las componen sean reciclados. De esta forma, la célula es capaz de recuperar poco a poco la normalidad y

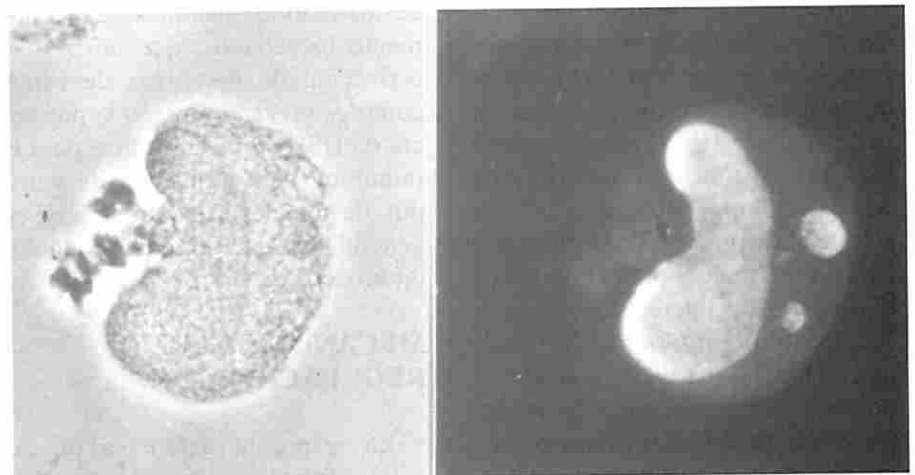


Figura 3. La proteína HSP70, inducida por un choque térmico, se localiza en determinadas regiones del nucleolo de las células. Para su detección se ha utilizado un anticuerpo específico, antiHSP70, obtenido en conejos, y un segundo anticuerpo anti-conejo marcado con Fluoresceína. A la izquierda, imagen en contraste de fases, a la derecha imagen por fluorescencia indirecta (4).

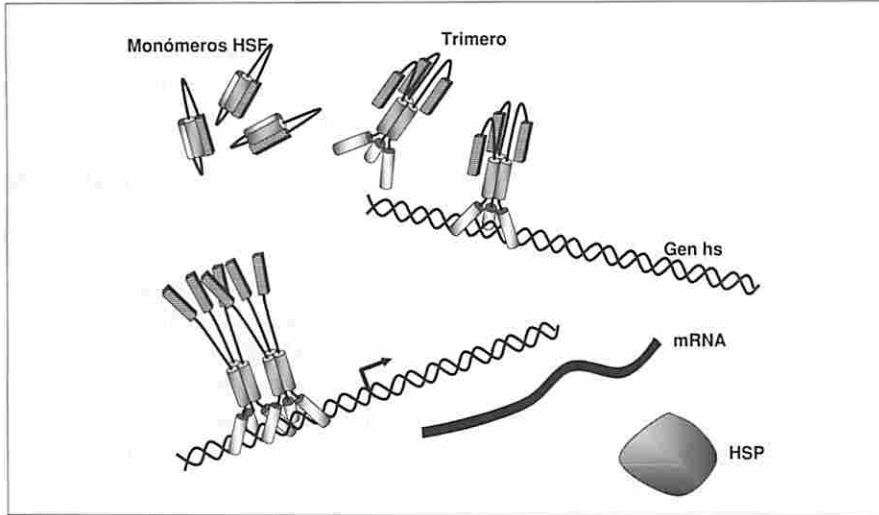


Figura 4. El esquema resume el mecanismo de regulación de los genes *hs*, mediado por el factor de transcripción específico HSF. La activación del HSF permite su unión a las regiones reguladoras comunes a todos los genes de estrés, HSE, que se encuentran en el promotor. La unión del HSF al HSE activa la transcripción de estos genes a los respectivos RNAs, y éstos codifican la síntesis de proteínas HSPs.

sobrevivir a situaciones que de otro modo resultarían letales.

Diversas condiciones fisiológicas, como el envejecimiento, la isquemia, la fiebre, y fisiopatológicas, como las enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes y víricas, que llevan asociadas cambios en la acumulación de proteínas dañadas o con conformaciones erróneas, provocan una expresión elevada de las HSPs.

Una de las pruebas inequívocas del papel protector que tienen las HSPs es el fenómeno conocido como *termotolerancia*. Si las células se someten durante un breve periodo de tiempo a una leve hipertermia de manera que provoque la síntesis de las HSPs, pueden sobrevivir posteriormente a una drástica subida de temperatura que hubiera sido letal de no estar protegidas por las HSPs inducidas por el tratamiento previo. Más interesante aún es el fenómeno de *tolerancia cruzada* que en muchos casos se ha observado entre distintos agentes de estrés: las HSPs sintetizadas como consecuencia de la exposición a un determinado agente protegen a las células para enfrentarse a una situación de estrés diferente (6).

Una interesante aplicación derivada de estas características de la

respuesta de estrés y de la función protectora de las HSPs se utiliza actualmente en la preservación de órganos extraídos durante el tiempo que deben permanecer en condiciones de isquemia y frío previo al trasplante. Diversos protocolos incluyen tratamientos condicionantes suaves, de manera que induzcan elevados niveles de HSPs que servirán para proteger al órgano durante las horas anteriores al trasplante (7).

Otra importante aplicación de las HSPs es en el campo de la Biología Ambiental. Actualmente se están desarrollando sistemas, especialmente bacterianos, que utilizan la activación de los genes de estrés como *genes reporteros*, o la presencia de HSPs como *sensores*, para la monitorización ambiental de vertidos de metales, xenobióticos y en general para detección de productos citotóxicos.

MECANISMOS DE REGULACIÓN

La respuesta defensiva de las células frente a un agente estresante es de una complejidad sorprendente, pero a la vez un modelo de estrategia de una economía y una eficiencia extraordinaria. No se trata de un sistema listo para actuar, las células

no gastan energía en disponer de un ejército defensivo, sino que se trata de una respuesta genéticamente programada que implica tres pasos previos para ser efectiva: tienen que activarse los genes *hs* o de estrés, transcribirse sus RNAs, y traducirse para dar las proteínas de estrés, que son los agentes defensivos. Todo esto ocurre rápidamente, de forma coordinada y en unas condiciones obviamente muy desfavorables para cualquier actividad celular.

¿Cómo se produce la activación rápida y coordinada de todo este grupo de genes? La transcripción de los genes de estrés está mediada por un factor de transcripción específico, conocido como factor de choque térmico o HSF (Heat Shock Transcription Factor), que actúa como puente molecular entre el estrés y las HSPs. Frente a un único HSF en bacterias como *Escherichia coli* o en insectos como *Drosophila melanogaster*, en humanos se han descrito cuatro HSF diferentes, que parecen estar relacionados con distintos agentes de inducción, siendo el más importante el HSF1. En condiciones normales el HSF1 está inactivo. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de activación, se sabe que el estrés provoca la translocación de monómeros de HSF1 del citoplasma al núcleo, y el ensamblaje de estas unidades para formar trímeros. Todos los genes de estrés tienen delante, en la región del promotor del gen, unas secuencias específicas comunes y conservadas en todos ellos, denominadas HSE (Heat Shock Element) (8), que son reconocidas por el HSF produciéndose la unión y la fosforilación del trimero, y la activación transcripcional del gen. La eficiencia de la respuesta, y por tanto la supervivencia de la célula, depende en gran medida de la velocidad con que se lleve a cabo la activación de los genes *hs*, por lo que a temperaturas normales o en condiciones no estresantes encontramos el promotor de estos genes preparado, por ejemplo con la RNA polimerasa II aunque inactiva, para que llegue el HSF y la ponga en marcha. Otro hecho muy interesante

Secuencia reguladora HSE

Secuencia consenso													
G	GAA	AA	TTC	TA	GAA	AA	TTC	GA	GAA	TT	TTC		
C	GAA	TA	TTC	TA	GAA	TC	CCA	AA	ACA	AA	CTG	-233	<i>D. melanogaster</i> hsp70
C	GAA	TG	TTC	GC	GAA	AA	GAG	CG	CCG	GA	GTA	-32	<i>D. melanogaster</i> hsp70
A	GAA	AC	TTC	CA	CGG	AG	TTC	GC	TAA	AG	AAC	-166	<i>D. melanogaster</i> hsp22
T	TCT	TT	TTC	CA	GAA	CG	TTC	CA	TCG	GC	GGC	-179	Levadura YG100
A	GGA	CC	TTC	TA	GAA	CA	TTC	TA	AAC	GG	CTG	-1306	<i>C. Elegans</i> hsp16

Figura 5. En la tabla se representa la secuencia de bases nitrogenadas correspondiente a los HSE. Éstos elementos se encuentran en las regiones promotoras de todos los genes de estrés conocidos. Se indican algunos ejemplos concretos en diferentes especies, y la distancia en bases al inicio de la región codificante del gen o inicio de la transcripción (8).

que merece la pena resaltar es que, a diferencia de la mayoría de los genes eucariotas, los genes de estrés no poseen intrones, o secuencias no codificantes que interrumpen el mensaje. Esto evita que sea necesario un largo y complejo procesamiento de los RNAs, de forma que una vez producidos están listos para ser traducidos a las proteínas HSPs.

¿Cómo se detectan los cambios y las situaciones de estrés, cuál es el sensor en las células? Aunque ha sido objeto de muchos estudios, por el momento resulta controvertido cómo las células son capaces de detectar los cambios de temperatura o de otros factores ambientales que desencadenan la respuesta de estrés. Una de las hipótesis manejadas supone que el desequilibrio entre proteínas dañadas y proteínas funcionales en el interior celular es el punto de inicio de la respuesta. El incremento en proteínas anormales hace que se agoten los niveles basales de chaperonas, incluso se piensa que la respuesta podría estar autorregulada por la HSP70. En condiciones normales, la HSP70 se encuentra unida al HSF1 y la presencia de altos niveles de proteínas agregadas o mal plegadas haría que éstas compitieran con el HSF1 por unir la HSP70. El HSF1 quedaría libre para translocarse y formar los trímeros en el núcleo, desencadenando la activación de los genes de choque. Una vez que la situación de emergencia ha finalizado la HSP70 volvería a quedar libre para unirse al HSF1. Otros autores apuestan por un papel preponderante de las especies reactivas de oxígeno o de las ceramidas. Dado

que las células pueden responder de manera muy variada a un mismo estímulo, no es de extrañar que el factor que dispara la respuesta dependa del estado metabólico y funcional de la célula e implique varias posibilidades.

Hoy día, más de cuarenta años después del descubrimiento de Ritossa, podemos decir que una subida accidental de la temperatura de una estufa, permitió que un científico curioso y poco estresado, no muy común hoy día, dedicara tiempo a analizar cómo podría haberle afectado a sus moscas. Los puffs de las moscas llevaron a descubrir toda una familia de genes y de proteínas de choque térmico, y éstas nos condujeron a un mecanismo universal frente al estrés que hemos tratado de definir a lo largo de este artículo.

Sin embargo, cuando las condiciones son muy desfavorables hay otra alternativa, también programada genéticamente, que es iniciar la *apoptosis*, o muerte celular programada. La irreversibilidad a partir de cierto punto de esta última opción hace que sea de vital importancia la existencia de un intercambio de información entre las distintas rutas de la célula. Actualmente, están apareciendo nuevos datos que muestran el papel de la HSP70 en el control de la *apoptosis*, por ejemplo cuando es activada por las especies reactivas del oxígeno como el superóxido o el peróxido de hidrógeno. La relación entre respuesta de estrés y *apoptosis* sugiere otras funciones, hasta ahora desconocidas de las HSPs, que se concretan día a día con nuevos datos que apuntan a su

capacidad para actuar en procesos de inmunización o a su posible papel en relación con el cáncer. Así, lo que empezó siendo un descubrimiento casual ha sido el inicio de una historia que, lejos de estar próxima a su final, parece querer ofrecernos una amplia visión de lo que es la célula, de la complejidad, economía y eficiencia de sus estrategias de supervivencia y de su capacidad de adaptación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ritossa, F.: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571, 1962.
- [2] *Heat shock, from bacteria to man*. Eds. Schlessinger, Ashburner, Tissières. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- [3] Carretero, T., Carmona, M.J., Morcillo, G., Baretino, D.: *Asynchronous expression of heat shock genes in Chironomus*. *Biology of the Cell* **56**, 17, 1996.
- [4] Morcillo, G., Gorab, E., Tanguay, R., Díez, J.L.: *Specific intranucleolar distribution of Hsp70 during heat shock in polytene cells*. *Experimental Cell Research* **236**, 361, 1997.
- [5] *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Eds. Morimoto, Tissières, Georgopoulos. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- [6] *Stress-inducible cellular responses*. Eds. Feige, Morimoto, Yahara, Polla. Birkhäuser Verlag, 1996.
- [7] *Heat shock response and organ preservation: models of stress conditioning*. Ed. Perdrizet. Springer Verlag, 1997.
- [8] Martínez, J.L., Tilman, S., Morcillo, G., Díez, J.L.: *Heat shock regulatory elements are present in telomeric repeats of Chironomus*. *Nucleic Acid Research* **29**, 4760, 2001.

Cell Stress Society International

<http://www.cellstress.uconn.edu/index.html>

Gloria Morcillo Ortega

Fac. de Ciencias. UNED

José Luis Martínez-Guitarte

Fac. de Medicina (Univ. de Lérida)