

HIGIENE Y SANIDAD AMBIENTAL

Hig. Sanid. Ambient. **3**: 36-44 (2003)

Dirección

Prof. Miguel Espigares García

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada, España. Telf: 958 243 169. Fax: 958 249 958. E-mail:
mespigar@ugr.es

Comité de redacción

Prof. Milagros Fernández-Crehuet Navajas. E-mail: fcrehuet@ugr.es

Prof. Pablo Lardelli Claret. E-mail: lardelli@ugr.es

Prof. Obdulia Moreno Abril. E-mail: omoreno@ugr.es

Prof. José Antonio Pérez López. E-mail: japerez@ugr.es

Redacción

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada, España. Telf: 958 243 169. Fax: 958 249 958. Email:
mespigar@ugr.es

Depósito legal GR-222/2002

ISSN 1579-1734

Higiene y Sanidad Ambiental es una revista electrónica en español, de difusión gratuita, que publica trabajos de investigación originales, revisiones y procedimientos técnicos, con un contenido relativo al área científica de Higiene y Sanidad Ambiental: criterios de calidad ambiental; contaminación de agua, aire y suelo; análisis de riesgos y exposición ambiental, industrial y laboral; epidemiología ambiental; técnicas de saneamiento; higiene de los alimentos; higiene hospitalaria; antibióticos, desinfección y esterilización; tratamiento de aguas y residuos sólidos; etc. También podrán ser publicados artículos relativos a la docencia universitaria de estos contenidos.

Los artículos para la publicación en la revista *Higiene y Sanidad Ambiental*, deben ser enviados a la Dirección de la revista en soporte electrónico con formato de Microsoft Word (o compatible), con un estilo editorial internacionalmente aceptado en las publicaciones científicas (título, resumen, palabras clave, introducción, material y métodos, resultados, discusión, bibliografía, etc.).

Las suscripciones a la revista *Higiene y Sanidad Ambiental* son gratuitas y se pueden realizar mediante el envío de un correo electrónico dirigido a la Dirección o Comité de Redacción, o pueden ser directamente obtenidas en la dirección electrónica del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Granada (www.ugr.es/%7Edpto_prev).

Proteínas de estrés y nutrición

E. Espigares Rodríguez * y M. D. Ruiz López **

* Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada. España. Tel. 958 243 169. Fax. 958 249 958. E-mail: elespi@ugr.es

** Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada. España. Tel. 958 243 868. E-mail: mdruiz@ugr.es

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de estrés fueron descritas por primera vez en 1962 por Ritossa en células de las glándulas salivares de *Drosophila*, después de ser expuestas a 37 °C durante 30 minutos y a continuación a su temperatura normal de 25 °C, lo que producía un incremento en la síntesis de proteínas con peso molecular de 70 y 26 kDa. Estas proteínas fueron llamadas *heat shock proteins* (Hsp).

Desde entonces se ha descrito un amplio número de proteínas de este tipo, denominadas en términos generales Hsp. No obstante, el shock térmico no es el único estímulo que puede inducir o incrementar la síntesis de Hsp. Otros factores pueden producir este efecto: exposición a análogos de aminoácidos y glucosa, metales pesados, arsenito sódico, infecciones microbianas, óxido nítrico, hormonas, o antibióticos.

Actualmente se realizan numerosas investigaciones en el campo de la proteómica para esclarecer numerosos aspectos, tales como estructura molecular, control y regulación, inductores, funciones, etc.

Sin embargo, un enorme campo de investigación se abre en salud pública: se inducen por sustancias tóxicas que se encuentran como contaminantes, y se alteran en numerosos procesos mórbidos. ¿Podrían estar influenciadas por la nutrición?. ¿Podrían tener utilidad para valorar el estado nutricional?.

LAS PROTEÍNAS DE ESTRÉS

Las proteínas de estrés o *heat shock proteins* (Hsp) las podemos dividir en diferentes grupos en función de su peso molecular (KIANG and TSOKOS, 1998).

Las proteínas del shock térmico pueden actuar como *chaperones intracelulares*. La familia de

proteínas Hsp, que representan el 2-15% del total de las proteínas celulares, están entre las proteínas altamente conservadas en organismos procariotas y eucariotas. Estas proteínas las podemos clasificar en función de su peso molecular: Hsp70, 60, 90 y 27. Las Hsp se definieron como aquellas proteínas sintetizadas después de la exposición de la célula a temperaturas de 5-10° C por encima de la temperatura normal. Las Hsp se consideran proteínas de estrés desde el momento en que son inducidas en respuesta a un amplio espectro de ofensas fisiológicas así como ambientales, incluyendo infección viral, inflamación, fiebre y exposición de las células a agentes oxidantes, citotoxinas y anoxia (BRENNER y WAINBERG, 1999).

Las proteínas del shock térmico realizan una serie de funciones principales como pueden ser: plegamiento de las proteínas que se lleva a cabo mediante los chaperones moleculares, participan en los mecanismos de transducción de señales y regulación de la expresión génica y protegen a la célula en situaciones de estrés. Este modo de actuación frente al estrés es una manera de adaptación por parte de la célula (BROCHE VALLE y cols., 1999).

Cuando las proteínas del shock térmico actúan como chaperones moleculares pueden unirse a péptidos celulares, proteínas y complejos multiméricos. Las Hsp nos pueden conducir al plegamiento de proteínas, biogénesis, transporte y degradación. La aparición de diferentes estímulos hacen que las Hsp activen una serie de mecanismos metabólicos y proliferativos de la célula.

Por ejemplo, las Hsp70 tiene la función de estabilizar la estructura cuando está en competencia entre un estado desplegado y un estado de ensamblaje, durante un largo periodo de tiempo. Las Hsp60 mitocondrial da lugar a la formación de un anillo oligomérico, en donde va a tener lugar el

ensamblaje de la proteína al estado nativo. Las Hsp90 tienen un papel como supresor en la regulación, mediante la unión a diferentes enzimas, factores de transcripción y receptores glucocorticoides. Por último, las Hsp27 impide la agregación de proteínas y protege frente a la polimerización.

Varios estudios han demostrado que el plegamiento de proteínas y su ensamblaje no se produce de una manera espontánea sino que requiere la ayuda de una serie de proteínas que reciben el nombre de *chaperones moleculares*, uniéndose a proteínas desplegadas o desensambladas, aunque no tienen especificidad por el sustrato ya que no son enzimas por lo que se podrá unir a cualquier proteína. Estos chaperones impiden la interacción proteína-proteína, ya que conduciría a un incorrecto plegamiento y facilita el plegamiento debido al secuestro de una serie de intermediarios (KIANG y TSOKOS, 1998). Estos chaperones moleculares interaccionan con una gran cantidad de componentes, formando un sistema que va a funcionar como una cooperativa, produciéndose así un perfecto plegamiento de la proteína. Es decir, estos chaperones moleculares van a controlar que el plegamiento se haga de la mejor forma posible (BROCHE VALLE y cols., 1999).

Al principio se pensaba que las proteínas se iban plegando a medida que se iban sintetizando, pero hoy día esta hipótesis se ha desechado ya que las proteínas se pliegan con la ayuda de los chaperones moleculares (mencionadas en el párrafo anterior), también se les llama proteínas acompañantes o chaperoninas, estas no forman parte de un complejo sino que está muy distribuida. Cuando existen proteínas desplegadas o mal plegadas, los chaperones se unen a ellas y facilita su plegamiento luego se separan de ellas liberándolas, para esta función los chaperones necesitan una serie de energía que la adquieren del ATP. Existen otras proteínas acompañantes que lo que hacen es poner en contacto las proteínas no plegadas con los chaperones. Además de plegar a las proteínas que no estaban plegadas va a realizar el replegamiento de proteínas que han sido desnaturalizadas, como consecuencia de elevadas temperaturas (MADIGAN y cols., 1997).

Existen diferentes tipos de chaperones moleculares: Hsp70 y 60 (los números nos indican el peso molecular de las proteínas) se encuentran tanto en eucariotas como en procariotas, la nomenclatura de estas proteínas son diferentes entre las eucariotas y las procariotas (KIANG y TSOKOS, 1998). Las Hsp70 se unen a cadenas polipeptídicas durante la síntesis proteica y a proteínas completamente formadas después de su liberación en los ribosomas; las Hsp60 se unen a proteínas desplegadas, previenen la agregación y facilitan su plegamiento. En general, se utilizan para alcanzar un correcto plegamiento de la proteína, ya que aunque está programado desde el principio siempre ocurren errores que nos lleva a un fatal plegamiento.

Estos chaperones moleculares van a ayudar en la translocación de proteínas a través de la membrana de diferentes compartimentos, cuando están pasando a través de la membrana la transducción se va a parar para que la cadena polipeptídica no se alargue mucho, ya que puede ocurrir que se pliegue y obstruya el canal de paso. La actuación que realizan los chaperones para transportar las proteínas se ve favorecida por la ayuda de unos co-chaperones, como puede ser el GrpE (que cataliza el intercambio de ADP/ATP en la HSC70) así como Hsp10 que se une a Hsp60, regulando su actividad de chaperón molecular. Todos estos cofactores nos llevan a la maduración del proceso alcanzando una conformación nativa de la proteína (BROCHE VALLE y cols., 1999).

Los chaperones moleculares, inducidos en respuesta al estrés, se ha visto que son claves para la regulación en el control de la apoptosis y el crecimiento de la célula. Diferentes estudios nos indican que funcionan como blanco para el diagnóstico y tratamiento del cáncer (JOLLY y MORIMOTO, 2000) y las Hsp que interaccionan con proteínas VIH-1, pueden servir como vehículo para la liberación y el diseño de vacunas frente al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (BRENNER y WAINBERG, 1999).

La respuesta molecular al estrés fisiológico y ambiental, alerta a las células de un peligro inminente y las protege genética y biosintéticamente de sustancias que producen un daño letal. La exposición a diversos tipos de estrés ambiental, incluyendo elevadas temperaturas, luz ultravioleta, oxidantes, tóxicos químicos, moléculas farmacológicamente activas y mutágenos, dan lugar a la inducción de la expresión de proteínas del shock térmico y chaperones moleculares que nos llevan al reestablecimiento de la homeostasis de la proteína.

La respuesta al shock térmico representa un proceso genéticamente regulado, iniciado por la exposición a diversas formas de estrés ambiental y fisiológico, que resulta de la activación de la codificación de genes de chaperones moleculares, proteasas y otros genes inducibles que funcionan durante la protección y recuperación del estrés (NOLLEN y MORIMOTO, 2002).

Aunque desde los orígenes, el shock térmico se ha asociado primeramente a causas ambientales, también se ha llegado a asociar con estrés tanto fisiológico como bioquímico, incluyendo la respuesta celular a la infección causada por agentes virales y bacterianos, exposición a metales pesados de transición, análogos aminoácidos, pequeñas moléculas farmacológicamente activas y oxidantes. Común a todos estos tipos de estrés son los efectos en la biogénesis de la proteína asociados con la síntesis de proteínas, plegamiento, translocación, ensamblaje y degradación. El estrés desafía a la homeostasis de la proteína produciendo un incremento del flujo de proteínas no nativas, así como un incremento del desplegamiento y asociación a agregados de proteínas. Como consecuencia, la respuesta al shock

térmico a través de una síntesis elevada de chaperones moleculares y proteasas, responde rápidamente a señales de estrés ambiental y fisiológico, reparando el daño proteico y reestableciendo la homeostasis de las proteínas.

Estudios sobre la respuesta al shock térmico han demostrado que la exposición al estrés puede ser bueno ya que protege a células de la actuación de sustancias químicas que son letales y otras formas de estrés. Esto revela un importante papel de la respuesta al estrés en la adaptación y la supervivencia (NOLLEN y MORIMOTO, 2002). La respuesta que se produce frente a condiciones de estrés es un mecanismo de defensa que utilizan las células para defenderse de situaciones que causan efectos nocivos, como puede ser el desplegamiento de proteínas y agregación, aumentando así la supervivencia, tanto de organismos, plantas y células animales. Este mecanismo que se origina a causa del shock térmico puede estar controlado mediante un mecanismo feedback o por autorregulación (HOLMBERG, 2000).

La regulación de la respuesta al shock térmico casi siempre ocurre a nivel transcripcional, aunque variará en las diferentes especies. En eucariotas cuando se produce un estímulo, el estrés térmico por ejemplo, el HSF (que se trata de un factor transcripcional) va a unirse a HSE y va a facilitar la transcripción de los genes asociados con la respuesta. Esta transcripción está modulada por la fosforilación del HSF, al fosforilarse se une al HSE, aunque en algunas especies cuando se fosforila, en vez de unirse, se separa. Esta fosforilación va a estar regulada por una gran cantidad de enzimas y factores. Los factores del shock térmico van a tener un papel regulador en la transcripción de los genes para la síntesis de las Hsp.

Cuando se produce el estrés térmico, como anteriormente hemos expuesto, aparece un aumento en las proteínas total o parcialmente desnaturalizadas, estas se van a unir a las Hsp para que se realice un correcto plegamiento. Al disminuir las Hsp a las que se una estas proteínas desnaturalizadas, se produce la unión de HSF y HSE, iniciándose la transcripción de los genes del shock térmico. En mamíferos, en la regulación, además de los elementos citados anteriormente, se va a incluir una vía dependiente y otra independiente de ATP (BROCHE VALLE y cols., 1999).

La aparición de respuesta al shock térmico puede que se deba a la aparición de alguna enfermedad inflamatoria y en este caso, se le atribuye un efecto citoprotector. Se ha comprobado que cuando aparecen esta serie de enfermedades, así como enfermedades coronarias como puede ser la isquemia, se va a producir una elevada expresión de las proteínas de estrés, produciendo, como hemos citado al principio del párrafo tiene un efecto citoprotector. Este aumento en la expresión de las proteínas de estrés ocurre como una adaptación de la célula a esta nueva situación. Este aumento de las proteínas de estrés nos conducirán a una normal síntesis de

proteínas del miocardio (en el caso de la enfermedades coronarias), cambio en las proteínas que no están plegadas y una función normal de este órgano; todo esto sucede después de haberse producido un daño celular, y como respuesta de los miocardiocitos para sobrevivir.

En estas enfermedades existe un daño celular que empeorará si además hay una exposición a toxinas, como xenobióticos, por lo que para conseguir el efecto citoprotector se debe de producir una sobreexpresión de uno o más genes de las proteínas de estrés. Para que suceda un aumento en las proteínas del shock térmico se usa la manipulación genética, aunque actualmente se utiliza como alternativa la aplicación de pequeñas moléculas farmacológicamente activas, como pueden ser herbimicina A o derivados de la hidroxilamina. La utilización de los salicilatos va a dar lugar a la preparación de la célula para otros tipos de estrés, provocan un aumento en la transcripción de los genes de las proteínas del shock térmico y por último, un efecto citoprotector de daño causado en las células debido a un aumento de la temperatura (MORIMOTO, 1999).

Los diferentes tipos de estrés que dan lugar a una elevada expresión de genes de shock térmico pueden estar clasificados en 4 categorías:

1. Estrés ambiental (shock térmico, fármacos, estrés oxidativo, tóxicos químicos y pequeñas moléculas farmacológicamente activas).
2. Condiciones normales (ciclo celular, factores de crecimiento, estimulación del suero, desarrollo, diferenciación y activación por ciertos oncogenes).
3. Estrés fisiológico y diferentes estados de enfermedad (hormonas endocrinas, daño y reparo tisular, fiebre, inflamación, infección, isquemia, reperfusión y cáncer).
4. Enfermedades de agregación de proteínas (enfermedad de Huntington's, enfermedad de Alzheimer y del Parkinson y ALS).

En cada una de estas categorías, las condiciones indicadas están asociadas con la sobreexpresión de una o más proteínas del shock térmico a través de la activación de factores del shock térmico (HSF) y la respuesta al shock térmico (NOLLEN y MORIMOTO, 2002).

El estrés, el estado fisiológico y un estado patofisiológico va a provocar diferentes situaciones dentro de la célula que pueden ser fatales. En este tipo de situaciones se puede producir un desplegamiento de las proteínas que se encuentran en estado nativo, así como un daño en el DNA que puede provocar la liberación del citocromo C de la mitocondria y la activación del ligando Fas/FasL, que producen la activación de enzimas como la caspasa, estas dos situaciones provocan la muerte celular por apoptosis. También se va a producir la activación del p53 aumentando la transcripción de genes de las

Hsp70 y disminuyendo la transcripción de otros genes, como son aquellos que proporcionan resistencia a numerosos fármacos. La p53 va a ser también activada por especies reactivas de oxígeno, provocando la liberación del citocromo C, de Hsp60 y 10, estas dos últimas van a acelerar la activación de enzimas como la caspasa produciendo la muerte celular por apoptosis, como se ha comentado anteriormente.

Estas situaciones nos pueden llevar a que enzimas como las kinasas se activen, provocando una activación de las caspasa, llevándonos a la muerte celular mediante apoptosis.

En todas estas condiciones, las Hsp tienen un papel fundamental impidiendo que suceda la muerte celular, actuando:

1. Como intermediarios en el plegamiento de proteínas desplegadas, alcanzando su estado nativo.
2. Regulando su propia síntesis (autorregulación).
3. Inhibiendo la liberación del citocromo C de la mitocondria, por lo que no se produce la activación de la enzima caspasa.
4. Impidiendo la activación de las kinasas.

Existen un tipo de proteínas, las Hsp27, que actúan impidiendo que aparezcan especies reactivas de oxígeno y que se activen ligandos Fas/FasL; si se produce la activación del ligando entonces actuará de manera que impedirá la activación de la caspasa para que no se alcance la muerte celular.

Por otra parte, las Hsp se dirigen hacia la superficie celular, actuando como antígenos o como moléculas presentadoras de antígeno (JOLLY and MORIMOTO, 2000).

HSP Y NUTRICIÓN

Restricción calórica

Existen evidencias de que la dieta, no sólo puede constituir una causa de estrés celular, sino que puede también modificar la respuesta frente a diversos factores inductores de estrés fisiológico. Se habla de restricción calórica cuando a los animales se les suministra sólo el 60 – 70 % de las calorías de la dieta *ad libitum*, pero suplementando la dieta con las cantidades adecuadas de vitaminas y minerales para evitar deficiencias.

Se han realizado algunos estudios que tratan de relacionar Hsp y restricción calórica. Entre ellos podemos citar el realizado en ratas por DUFFY y cols., (1997). Para la realización de este estudio, los animales son criados en un medioambiente libre de patógenos a 23 °C y con un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Los animales del test son divididos en dos grupos: uno control que son alimentados *ad libitum*, y otro grupo en restricción calórica que recibe el 60 % del valor medio de consumo del grupo

control desde la edad de 16 semanas hasta el final de la experiencia.

Entre los parámetros controlados se ha incluido el cociente respiratorio, que es el cociente entre el dióxido de carbono producido y el oxígeno inhalado, siendo un parámetro que predice los niveles relativos de metabolismo glucídico y lipídico. El valor diario del cociente respiratorio es mucho más alto en los animales en restricción calórica que en los alimentados *ad libitum*. Esto sugiere que los animales en restricción calórica reducen rápidamente sus reservas de carbohidratos a las pocas horas después de consumir su ración alimenticia y sobreviven mediante el metabolismo de las grasas hasta que llega de nuevo el alimento.

Los estudios de restricción calórica aguda se llevan a cabo para determinar si el comportamiento y los efectos fisiológicos observados bajo condiciones crónicas podrían ser desencadenados por un cambio rápido en la ingesta alimentaria durante un periodo de sólo unas horas o días. Las experiencias son realizadas alimentando a los ratones con doble ración durante un día, seguido por un día de ayuno, manteniendo en conjunto un nivel del 60 % de la alimentación *ad libitum*.

Además de producirse amplias fluctuaciones en la temperatura, coeficiente respiratorio y niveles de glucosa circulantes, la restricción calórica en roedores puede producir la expresión de Hsp en el hipotálamo. También se ha observado en animales sometidos a restricción calórica que el incremento de glucosa circulante después de comer conduce a la expresión en el hipotálamo de una proteína de estrés glucosa dependiente (ALY y cols., 1994).

Algunos autores sugieren que la restricción calórica actúa como un estrés suave basándose, entre otros datos, en que la restricción calórica provoca un aumento de la secreción de corticosterona y glucocorticoides, y sobre todo, una elevada expresión de Hsp (MINOIS, 2000). La restricción calórica puede operar vía control hipotalámico para regular la función endocrina. Estos cambios pueden conducir a bajas temperaturas corporales, disminución del metabolismo de los carbohidratos y aumento de los mecanismos reparadores de DNA. Por consiguiente, es probable que los cambios descritos puedan promover cambios neuroquímicos que a su vez pueden disminuir el envejecimiento e incrementar la resistencia a enfermedades, agentes químicos extraños y efectos medioambientales adversos. Estudios de la dieta en relación a la enfermedades de Parkinson y Alzheimer parecen indicar que la restricción calórica constituye un factor de protección, y es uno de los métodos más eficientes para aumentar la longevidad (MINOIS, 2000).

Glúcidos

KAGEYAMA y cols. (2000) han observado que una dieta rica en azúcares puede modificar la

respuesta al estrés térmico. Estos autores comparan dos lotes de ratas sometidas a distinta alimentación: un grupo es alimentado con una dieta que contiene (en porcentaje de calorías) 60 % de sacarosa, 11 % de aceite de maíz y 29 % de proteínas animales; el alimento del otro grupo contiene 60 % de almidón vegetal, 11 % de aceite de maíz y 29 % de proteínas animales. Los animales son sometidos a estas dietas durante una semana. A continuación, todas las ratas son sometidas a estrés mediante inmovilización durante 1 hora, y al final de este periodo son sacrificadas, obteniéndose muestras de sangre, corteza cerebral, cerebelo e hipotálamo. El estrés por inmovilización aumenta los niveles de glucosa en plasma en los dos grupos de alimentación, pero sólo en el grupo alimentado con sacarosa se producen Hsp27 y Hsp70 en el hipotálamo y cerebelo, y Hsp70 además en la corteza cerebral, mientras que no encuentran estas proteínas en las ratas con dieta normal. La dieta de sacarosa por sí misma es incapaz de inducir la expresión de Hsp27 y Hsp70, y el estrés por inmovilización por sí sólo tampoco. Así, estos resultados sugieren que la dieta de sacarosa juega un papel como inductor de la expresión de Hsp27 y Hsp70 bajo condiciones de estrés.

Lípidos

Se ha señalado que alteraciones en la calidad y cantidad de las grasas de la dieta, así como anomalías en el metabolismo lipídico, influyen en la regulación del sistema inmune. Además, se demostró que ratones mantenidos con una dieta lipídica disminuye la respuesta inmunitaria.

Se ha comprobado que los linfocitos esplénicos de ratón sometidos a una dieta que contiene 24 % de ácidos grasos saturados muestra la presencia de Hsp60 y Hsp70. En ratones con una dieta rica en ácidos grasos saturados, ambas proteínas aparecen a partir de 1 mes, mientras que si la dieta es rica en ácidos grasos insaturados un mínimo incremento significativo de Hsp60 y Hsp70 no se observa hasta 2 – 4 meses. También una dieta rica en ácidos grasos saturados produce un incremento pequeño de Hsp25 y Hsp27 durante el primer mes, aumentan durante el segundo mes y persisten más de 3 – 4 meses. Por el contrario, una dieta rica en ácidos grasos insaturados produce una marcada inducción a los 30 días y se mantiene constante más de 4 meses (ROMANO CARRATELLI y cols., 1999).

De acuerdo con los datos expuestos, una dieta rica en ácidos grasos induce la expresión de Hsp de 70, 60, 27 y 25 kDa en los linfocitos esplénicos. La función de chaperón de las Hsp es de la mayor importancia en la síntesis y mantenimiento de las proteínas; la distribución ubicua de las Hsp y el alto grado de conservación de sus secuencias suponen un desafío al sistema inmune. Un incremento de los niveles de Hsp (mRNA y proteínas) se produce durante la activación de los macrófagos, en la que se

inducen una amplia variedad de polipéptidos. La composición de la dieta puede tener una gran influencia en procesos inmunitarios y autoinmunes, por la alteración de la activación linfocitaria.

Micronutrientes

Hierro y cobre han sido dos de los micronutrientes estudiados en relación con las Hsp. Ambos afectan a la actividad de diversos sistemas enzimáticos y/o fisiológicos del organismo. Por ejemplo, el cobre influye en la actividad de la citocromo *c* oxidasa, de tal forma que en animales con deficiencia en cobre se ha observado una disminución de su actividad enzimática en el hígado, corazón, riñón, intestino delgado, bazo, timo y médula ósea. En los mamíferos la citocromo *c* oxidasa está constituida por 13 subunidades, de las que las unidades I – III están codificadas por DNA mitocondrial, y las restantes 10 unidades por DNA nuclear. Las subunidades I y II contienen cobre, y la subunidad I contiene hierro en 2 grupos hemo. Las subunidades codificadas por DNA mitocondrial tienen propiedades catalíticas, tales como transporte de electrones y translocación de proteínas, mientras que las unidades codificadas por DNA nuclear parecen tener funciones reguladoras.

MEDEIROS y cols. (1997) han estudiado la relación entre dietas deficientes en hierro y cobre, actividad del complejo enzimático citocromo *c* oxidasa, e inducción de Hsp. Para este trabajo utilizaron ratas, que se mantenían en jaulas individuales, con un ciclo de luz – oscuridad de 12 horas a 22 °C. La dieta basal presentaba la siguiente composición porcentual en peso: sacarosa, 50 %; caseína, 20 %; almidón, 15 %; y aceite de maíz, 5 %. Además se añadía una mezcla de vitaminas y minerales. Las ratas eran separadas aleatoriamente en 3 grupos. El grupo control era alimentado con la dieta anteriormente señalada, adecuada en todos los nutrientes conocidos, con cobre (6 mg/kg) añadido en forma de carbonato cúprico e hierro (40 mg/kg) adicionado en forma de citrato férrico. En el grupo carente de cobre, éste era omitido de la dieta, y en el grupo sin hierro, éste era reducido a 4 mg/kg en la dieta suministrada. Todas las ratas tenían libre acceso al alimento y agua destilada, y se mantenían con sus respectivas dietas durante un periodo de 6 semanas, siendo sacrificadas al final de dicho periodo. Tras recibir la correspondiente dieta durante 6 semanas, no existían diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal y en el peso del corazón de los tres grupos de ratas. Sin embargo, la razón corazón / peso corporal era significativamente mayor en las ratas alimentadas sin cobre y sin hierro. El valor hematocrito era significativamente menor en los grupos sin hierro y sin cobre. Las ratas con dieta sin cobre presentaban una disminución de los niveles hepáticos de cobre y un aumento de los de hierro, lo que indica una deficiencia de cobre. Los niveles hepáticos de hierro eran significativamente inferiores

en las ratas alimentadas sin hierro respecto del grupo control, lo que indica una deficiencia de hierro.

En lo que específicamente al cobre se refiere, las ratas deficientes de cobre presentaban bajos niveles hepáticos de cobre y hematocrito, pero una alta relación peso del corazón / peso corporal. La actividad citocromo *c* oxidasa también era significativamente menor, con valores de 21.0 ± 8.3 U/ μ g de proteína en el grupo control frente a 8.4 ± 1.0 U/ μ g de proteína en el grupo con deficiencia de cobre.

En este trabajo se determinaron también Hsp60 y Hsp70. Ninguna de las dos, expresadas en relación al contenido en actina, presenta diferencias significativas entre los tres grupos dietéticos establecidos. No obstante, los valores de Hsp60 eran mayores en los animales sin cobre, aunque las diferencias no son significativas, y parecen ser debidas a las pequeñas variaciones en los niveles de actina.

Otro microelemento en el que se ha estudiado con relación a la inducción de proteínas de estrés, y que puede ser ingerido, especialmente a través del consumo de agua, es el arsénico. Se encuentra en el medio ambiente en forma de óxidos o sulfuros, ampliamente distribuido en el agua, siendo las especies inorgánicas las más peligrosas. Las aguas de consumo contaminadas, así como los alimentos preparados con éstas constituyen la mayor parte de la ingesta de este elemento.

La exposición a arsénico causa muchos efectos adversos para la salud, incluyendo enfermedades cardiovasculares, hepáticas y renales, además de cáncer renal, hepático, pulmonar, de vejiga urinaria y piel.

El arsénico regula la expresión de la mayoría de las proteínas de estrés: Hsp27, Hsp32 (HO-1), Hsp60, Hsp70, Grp78, Hsp90, Grp94, Hsp110, Grp170. La expresión de estas proteínas se realiza mediante complejos mecanismos de regulación que requieren la integración de múltiples rutas con numerosos mecanismos de regulación (DEL RAZO y cols., 2001).

Procesos patológicos

Arteriosclerosis

La arteriosclerosis es un proceso multifactorial iniciado por la acumulación de macrófagos en distintas áreas de daño celular o endotelial seguido por la incorporación de gran cantidad de lípidos. Son muchos los factores endógenos y exógenos que determinan su aparición.

En la última década, aunque se ha considerado la gran importancia que la dieta tiene en la arteriosclerosis, se ha prestado un gran interés a la relación entre enfermedades cardiovasculares e infecciones leves de carácter crónico. Citomegalovirus, herpesvirus, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* y sepsis dentales han sido implicadas en la patogénesis de la arteriosclerosis, planteando la posibilidad de

que la inmunoestimulación asociada con la infección natural puede contribuir al riesgo cardiovascular. Es posible que la respuesta inmunespecífica a la inflamación pueda aumentar la respuesta frente a antígenos arteriales, y por lo tanto producir arteriosclerosis. Esto requiere la infección por un patógeno que elabore péptidos con regiones homólogas a las proteínas del huésped, como ocurre con las Hsp. Se han publicado trabajos que confirman lo expuesto. XU y cols. (1992) aporta las primeras evidencias de la relación entre la reacción inmunespecífica frente a Hsp65 y la formación del ateroma. Estos autores demostraron que conejos normocolesterolémicos inmunizados con Hsp65 o con *Mycobacterium tuberculosis* (bacteria rica en Hsp65) desarrollaban arteriosclerosis consumiendo una dieta normal. También encuentran un incremento en la expresión de Hsp60 dentro de las lesiones arterioscleróticas, y una respuesta humoral y celular a estos antígenos en personas con arteriosclerosis carotídea y coronaria.

Esto mismo ha sido demostrado más recientemente utilizando como modelo ratones LDL – RD (deficientes de receptores LDL), los cuales, con una dieta normal, desarrollaban una arteriosclerosis tras la inmunización con Hsp65 o con *Mycobacterium tuberculosis* (AFEK y cols., 2000).

Estudios clínicos también han revelado asociaciones entre niveles plasmáticos de anticuerpos anti-Hsp y enfermedades cardiovasculares. Se han encontrado niveles de anticuerpos frente a Hsp65 de micobacterias significativamente elevados en sujetos con lesiones vasculares. También se han mostrado estos niveles aumentados como un factor de riesgo en la arteriosclerosis grave. Estos anticuerpos anti-Hsp presentan reacción cruzada con Hsp60 humana, Hsp65 de *C. pneumoniae*, y GroEL de *Escherichia coli*.

Por lo tanto, entre los factores exógenos es indudable el papel tan importante que representa la dieta, y muy especialmente el contenido en colesterol, cuya ingesta se considera como uno de los factores de riesgo más importante, y como consecuencia, uno de los factores incluidos en la prevención de las enfermedades cardiovasculares. Las infecciones son otro factor exógeno en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Ambos factores exógenos, dieta e infecciones, están relacionados con la inducción de Hsp. Recientemente se han aportado numerosos datos relativos al papel del sistema autoinmune en la arteriosclerosis.

Un trabajo muy demostrativo, en el sentido anteriormente indicado, es el realizado por LAMB y FERNS (2002). Utilizan conejos como modelo animal, la mitad de los cuales son inmunizados con una dosis humana de BCG (vacuna atenuada de la tuberculosis) y una dosis de recuerdo a las 4 semanas. Todos los conejos, inmunizados y no inmunizados, son sometidos a una dieta con 1% de colesterol aproximadamente, individualizada para cada animal

hasta conseguir unos niveles séricos de colesterol entre 20 – 30 mmol/L. La inmunización con BCG aumenta la arteriosclerosis aórtica, pero no se produce en ausencia de una dieta rica en colesterol. La inmunización con BCG también elicitó anticuerpos frente a A60 (principal complejo antigénico citoplasmático de *Mycobacterium bovis*) y Hsp60 humana. Aunque se ha descrito que las lesiones arterioscleróticas pueden ser inducidas en situación de normocolesterolemia mediante inmunización con micobacterias o Hsp60 humana, la respuesta es insuficiente a largo plazo para producir arteriosclerosis en ausencia de niveles de colesterol elevados. Estos autores también observan que la producción de anticuerpos anti-Hsp60 coincide con la aparición de vWF en el plasma (un marcador de alteración endotelial que aumenta rápidamente tras la alimentación con colesterol), lo que parece indicar que elevados niveles plasmáticos de colesterol, además de alterar el endotelio pueden también inducir la expresión de Hsp en éste, lo que origina una respuesta autoinmune que aumentaría la inflamación y consecuentemente la arteriosclerosis.

Hace algún tiempo se pensaba que la expresión de Hsp60 estaba restringida a las mitocondrias intracelulares y por consiguiente incapaz de estimular una respuesta autoinmune. Actualmente se tienen evidencias de que Hsp60 pueden ser expresadas en la superficie endotelial o ser liberadas por células dañadas o muertas. La expresión de Hsp60 en la placa de ateroma ha sido correlacionada con la gravedad de la arteriosclerosis.

Enfermedades neurodegenerativas

En los últimos tiempos se vienen realizando una gran cantidad de estudios nutricionales, epidemiológicos y moleculares sobre la relación de las enfermedades neurodegenerativas con la dieta y de éstas con las Hsp. Estudios de la dieta con relación a las enfermedades de Parkinson y Alzheimer parecen indicar que los individuos con una baja ingesta de calorías presentan un menor riesgo. Por el contrario, los individuos que tienen un bajo nivel de ácido fólico en su dieta, los que sufren traumas cerebrales y los sometidos a exposiciones ambientales de pesticidas tales como la rotenona, presentan un mayor riesgo relativo. De igual forma que la arteriosclerosis para las enfermedades cardiovasculares, la sobrealimentación, dieta rica en grasas, tabaco, deficiencia de ácido fólico y estilo de vida sedentario son factores de riesgo para las enfermedades neurodegenerativas.

Junto a las numerosas sustancias asociadas a la dieta que ejercen un papel protector frente a las enfermedades neurodegenerativas, también existen numerosos mecanismos moleculares neuroprotectores. Además de enzimas antioxidantes y proteínas antiapoptóticas, las neuronas expresan varias proteínas llamadas chaperones que ejercen importantes acciones neuroprotectoras, a través de

sus funciones de plegamiento y eliminación de las proteínas dañadas. Dos chaperones que han demostrado un papel protector frente a desórdenes neurodegenerativos son Grp78 (glucose-regulated protein) y Hsp70 (MATTSON y cols., 2002).

Las determinaciones en el tejido cerebral de ratas que se han mantenido durante 3 meses en restricción calórica, en comparación con ratas control alimentadas *ad libitum*, muestran un incremento en los niveles de Hsp70 y Grp78 en las neuronas de diversas regiones, entre las que se encuentran la corteza y el hipocampo; al contrario, los niveles de Hsp60 permanecen inalterados. Otros estudios han mostrado que Hsp70 y Grp78 pueden proteger a las neuronas de lesiones causadas por oxidación celular y citotóxicos exógenos, de lo que se podría deducir que también pueden contribuir al efecto neuroprotector de la restricción dietética. Ésta podría producir un pequeño estrés en las neuronas por disminución de la energía disponible (glucosa), lo cual ha sido corroborado por estudios que muestran que el estrés metabólico inducido por administración de 2-deoxi-D-glucosa (un análogo de la glucosa no metabolizable) a animales alimentados *ad libitum* también aumenta la resistencia al daño celular en las neuronas. La ingesta de 2-deoxi-D-glucosa incrementa los niveles de Hsp70 y Grp78 en todas las regiones cerebrales examinadas (MATTSON y cols., 2001).

CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos aportados por diversos autores, las deficiencias nutricionales producen una situación de estrés celular y fisiológico, induciendo una respuesta similar a la producida en el organismo por otros factores ambientales y fisiológicos. Una de las manifestaciones de esta respuesta es la síntesis de Hsp (*heat shock protein*), que tienen como función principal el mantenimiento de funciones de síntesis, degradación, plegamiento, transporte y translocación de proteínas.

La restricción calórica actúa como un estrés poco intenso capaz de inducir la síntesis de proteínas de estrés, habiéndose descrito esta respuesta en células del hipotálamo, y la síntesis de Hsp70 y Hsp90.

La alimentación con glúcidos sencillos, como la sacarosa, parece ser necesaria para que se produzca una adecuada respuesta frente a diversas causas de estrés. Se ha comprobado que la inducción de Hsp27 y Hsp70 en el hipotálamo, cerebelo y corteza cerebral de ratas sometidas a estrés físico, sólo se produce en las alimentadas con sacarosa y no con almidón.

También, una dieta rica en ácidos grasos aumenta los niveles de Hsp25, Hsp27, Hsp60 y Hsp70, lo que puede tener una gran influencia en procesos inmunitarios y autoinmunes, por la alteración de la activación linfocitaria.

Los microelementos estudiados presentan una respuesta desigual como inductores de Hsp. Así, con

deficiencias de hierro y cobre no se observa respuesta significativa, mientras que la presencia de otros microelementos, como el arsénico, produce una inducción de Hsp.

En numerosos procesos patológicos crónicos, tales como arteriosclerosis o enfermedades neurodegenerativas, las Hsp parecen actuar como causa mediante el desarrollo de procesos autoinmunes, y en los que diversos componentes de la dieta juegan un papel muy importante.

Finalmente, existen numerosas demostraciones de que una inadecuada nutrición produce una respuesta fisiológica, en la que una de las manifestaciones es la inducción de la síntesis de Hsp. Por otra parte, para que se produzca una respuesta adecuada frente a una situación de estrés se requiere una nutrición adecuada. Sin embargo, se han realizado pocos trabajos que estudien estas relaciones, por lo que aún no se conoce suficientemente el valor de las Hsp como indicadores del estado nutricional.

BIBLIOGRAFÍA

- AFEK, A.; GEORGE, J.; GLBURD, B.; RAUOVA, L.; GOLDBERG, I.; KOPOLOVIC, J.; HARATS, D. and SHOENFELD, Y. (2000): Immunization of low-density lipoprotein receptor deficient (LDL-RD) mice with heat shock protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis. *J. Autoimmunity*, **14**: 115-121.
- ALY, K. B.; PIPKIN, J. L.; HINSON, W. G.; FEUERS, R. J.; DUFFY, P. H. and HART, R. W. (1994): Temporal and substrate-dependent patterns of stress protein expression in the hypothalamus of caloric restricted rats. *Mech. Ageing Dev.*, **76**: 1-10.
- BRENNER, B. G. and WAINBERG M. A. (1999): Heat shock protein-based therapeutic strategies against human immunodeficiency virus type I infection. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **7**: 80-90.
- BROCHE VALLE, F.; CÉSPEDES MIRANDA, E. M. y GARCÍA PIÑEIRO, J. C. (1999): Las proteínas de estrés en la biología molecular de la célula. *B.E.B.* **18**: 98-107.
- DEL RAZO, L. M.; QUINTANILLA-VEGA, B.; BRAMBILA-COLOMBRES, E. and EMMA S. CALDERÓN-ARANDA, E. S.; MANNO, M. and ALBORES, A. (2001): Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **177**: 132-148.
- DUFFY, P. H.; LEAKEY, J. E. A.; PIPKIN, J. L.; TURTURRO, A. and HART, R. W. (1997): The physiologic, neurologic, and behavioral effects of caloric restriction related to aging, disease, and environmental factors. *Environ. Res.*, **73**: 242-248.
- HOLMBERG, C. (2000): *Phosphorylation-mediated regulation of heat shock transcription factor 1*. Abo Akademi University. Abo, Finland.
- JOLLY, C. and MORIMOTO, R. I. (2000): Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**: 1564-72.
- KAGEYAMA, H.; SUZUKI, E.; KASHIWA, T.; KANAZAWA, M.; OSAKA, T.; KIMURA, S. NAMBA, Y. and INOUE, S. (2000): Sucrose-diet feeding induces gene expression of heat shock protein in rat brain under stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **274**: 355-358.
- KIANG, J. G. and TSOKOS, G. C. (1998): Heat shock protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacol. Ther.*, **80**: 183-201.
- LAMB, D. J. and FERNS, G. A. A. (2002): The magnitude of the immune response to heat shock protein-65 following BCG immunisation is associated with the extent of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **165**: 231-240.
- MATTSON, M. P.; DUAN, W.; CHAN, S. L.; CHENGA, A.; HAUGHEY, N.; GARY, D. S.; GUO, Z.; LEE, J. and FURUKAWA, K. (2002): Neuroprotective and neurorestorative signal transduction mechanisms in brain aging: modification by genes, diet and behavior. *Neurobiol. Aging*, **23**: 695-705.
- MATTSON, M. P.; DUAN, W.; LEE, J. and GUO, Z. (2001): Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. *Mech. Ageing Dev.*, **122**: 757-778.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. and PARKER, J. (1997): Macromoléculas y genética molecular. In *Brock Biología de los Microorganismos*. Pp: 178-225. 8ª ed. Prentice Hall Iberia. Madrid.
- MEDEIROS, D. M.; SHIRY, L. and SAMELMAN, T. (1997): Cardiac nuclear encoded cytochrome *c* oxidase subunits are decreased with copper restriction but not iron restriction: gene expression, protein synthesis and heat shock protein aspects. *Comp. Biochem. Physiol.*, **117A**: 77-87.
- MINOIS, N. (2000): Longevity and aging: beneficial effects of exposure to mild stress. *Biogerontology*, **1**: 15-29.
- MORIMOTO, R. I. (1999): Heat-shock response. In CREIGHTON, T. E.: *Encyclopedia of Molecular Biology*, Pp: 1088-1098. John Wiley and Sons, Inc.
- NOLLEN, E. A. A. and MORIMOTO, R. I. (2002): Heat shock response: cellular and molecular responses to stress, misfolded proteins, and diseases associated with protein aggregation. In *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, Pp: 1553-1563. John Wiley and Sons, Inc.
- ROMANO CARRATELLI, C.; NUZZO, I.; VITIELLO, T.; GALDIERO, E. and GALDIERO, F. (1999): The effect of dietary lipid manipulation on murine splenic lymphocytes apoptosis and heat shock protein over expression. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **24**: 19-25.

XU, Q.; DIETRICH, H.; STEINER, H. J.; GOWN A. M.;
SCHOEL, B.; MIKUZ, G.; KAUFMAN, S. H. E. and
WICK G. (1992): Induction of arteriosclerosis in

normocholesterolemic mice rabbits by
immunization with heat shock protein 65.
Arterioscler. Thrombosis., **12**: 789-799.