

## Preservación de los niveles de Hsp70 en tejidos mitóticos y post-mitóticos en ratones longevos de dos cepas distintas

**Irene Martínez de Toda Cabeza. Carmen Vida Rueda.**

Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. Avda. Complutense s/n, 28040 - Madrid  
[irene\\_mc90@hotmail.com](mailto:irene_mc90@hotmail.com)

**Tutora**

**Mónica De la Fuente del Rey**

Departamento de Fisiología Animal II. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais, nº2, 28040 - Madrid  
[mondelaf@bio.ucm.es](mailto:mondelaf@bio.ucm.es)

**Resumen:** La expresión de Hsp70 se induce ante situaciones de estrés, actuando como un mecanismo de defensa celular. Una disminución en esta inducción es característica del envejecimiento; mientras que el aumento de dicha inducción promueve la longevidad. No obstante, se desconoce si los niveles de Hsp70 basales pueden ser indicadores de cómo están envejeciendo los órganos de un individuo, así como el papel de tales niveles en la longevidad. El objetivo del trabajo fue evaluar los niveles basales de Hsp70 en órganos con diferente velocidad de envejecimiento (constituidos por células mitóticas ó postmitóticas) en animales longevos, en comparación con el resto de edades. Se usaron ratones hembras de dos cepas (ICR/CD1 y BALB/c) adultas, maduras, viejas y longevas (6, 12, 18 y 30 meses de edad, respectivamente) y se cuantificaron los niveles basales de Hsp70 en hígado, corazón y riñón (corteza y médula) mediante un kit de ELISA. Los resultados mostraron un patrón diferente en la variación con la edad de los niveles de Hsp70 en tejidos postmitóticos (corazón y corteza renal) y mitóticos (hígado y médula renal) y un mantenimiento de los niveles de Hsp70 en longevos, equiparables a los del adulto. Se puede concluir que la variación con la edad de los niveles de Hsp70 es específica de tejido, siendo un sistema de defensa adaptativo a la velocidad de envejecimiento de sus células. Los niveles preservados en los longevos evidencian la importancia de la Hsp70 en el envejecimiento saludable característico de la longevidad.

**Palabras clave:** Hsp70. Envejecimiento. Longevidad.

### INTRODUCCIÓN

El término chaperona ó heat-shock protein (Hsp) hace referencia a una amplia

familia de proteínas, cuyo papel principal es la de asistir y facilitar el correcto plegamiento de proteínas que están siendo sintetizadas en el ribosoma. Pero además de ser fundamentales en la síntesis “de novo”, la expresión de Hsp se induce en situaciones de estrés celular (choque térmico, estrés oxidativo, infección, inflamación, radiación, presencia de metales pesados...), en las que aumenta el número de proteínas mal plegadas, que ponen en marcha la llamada “heat-shock response” <sup>(1)</sup>. Además, las Hsp actúan a otros niveles en el control de la calidad proteica como son el marcaje de aquellas proteínas desplegadas que no pueden ser replegadas, para posterior degradación en el proteasoma <sup>(2)</sup> o la autofagia mediada por chaperonas <sup>(3)</sup>. Por tanto, las chaperonas juegan un papel central en el mantenimiento de la homeostasis celular, previniendo la agregación de proteínas, especialmente en condiciones de estrés celular, y constituyendo un importante mecanismo de defensa celular. De entre ellas, la que ha sido más ampliamente estudiada es la Hsp70 (heat shock protein 70 KDa) que comprende la Hsc70 (expresión constitutiva) y la Hsp70 ó Hsp72 cuya expresión es inducida en situaciones de estrés celular por medio del factor de transcripción HSF-1 (heat shock factor 1).

El envejecimiento puede definirse como la progresiva disminución del espacio homeodinámico, comprendiendo éste una efectiva respuesta al estrés celular, reparación del daño y una constante remodelación y adaptación <sup>(4)</sup>. Por lo que conforme se envejece, las células, y en general el organismo, pierden la capacidad de hacer frente y responder a situaciones de estrés, las cuales, al no ser contrarrestadas, se traducen en una acumulación de daño que conlleva la muerte celular. En el ámbito del control de la calidad proteica, el envejecimiento celular se caracteriza por la acumulación de proteínas dañadas que forman depósitos intracelulares que interfieren con el normal funcionamiento de la célula <sup>(5)</sup>. De acuerdo con esto, existen una serie de estudios que demuestran que la inducción de la expresión de la Hsp70 en respuesta a una situación de estrés determinada, se ve comprometida con la edad tanto “in vitro” como “in vivo” <sup>(6)</sup>. Por otro lado, estrategias que provocan la inducción de la síntesis de Hsp70 se han relacionado con un aumento de la longevidad <sup>(7, 9)</sup>. Éste es el caso de los llamados tratamientos horméticos, los cuales consisten en la exposición repetida y periódica a un estrés “suave”, y que se traducen en un efecto beneficioso para el organismo, fortaleciendo su espacio homeodinámico y con ello la capacidad de hacer frente a otro estrés más agresivo <sup>(8)</sup>. El hecho de que diferentes tratamientos horméticos (choque térmico, restricción calórica y ejercicio) que incrementan la expresión de Hsp70, den como resultado un aumento de la vida media, pone de manifiesto la implicación de las chaperonas en la longevidad.

Mientras que el déficit en la inducción de la síntesis de Hsp70 asociado al envejecimiento está bien documentado, la variación de los niveles basales de Hsp70 ha sido menos estudiada, existiendo aún mucha controversia en los resultados obtenidos. Analizar los niveles basales de Hsp70 es de vital importancia, ya que ciertos trabajos indican una correlación negativa entre los niveles basales de Hsp70 y la capacidad de respuesta ó inducción de Hsp70 frente a un estrés determinado <sup>(9)</sup>. Por este motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar la variación de los niveles basales de Hsp70

en órganos que envejecen más deprisa por estar constituidos por células postmitóticas, y más despacio, por tener células con capacidad mitótica, en animales de diferentes edades así como en aquellos que alcanzan una elevada longevidad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon ratones hembra ex-reproductoras (Harlam, Barcelona) provenientes de dos cepas distintas (ICR- CD1 y Balb/C). De cada cepa se analizaron 30-40 animales divididos en cuatro grupos de edad: adultos (6-7 meses), maduros (14 meses), viejos (20 meses) y longevos (29-30 meses).

Se determinó la cantidad de Hsp70 (ng/ml) presente en condiciones basales en corazón, hígado y riñón (tanto en médula como en corteza) mediante un ELISA comercial (Hsp70 EIA Kit, Enzo Life Sciences). Los diferentes tejidos (que habían sido almacenados a -80 °C hasta la realización del experimento) fueron homogeneizados en "Extraction Reagent", siguiendo las directrices de la casa comercial. Los homogeneizados fueron centrifugados a 20.000g durante 30 min a 4°C. Alícuotas de 100 µl del sobrenadante se emplearon para la determinación del contenido en Hsp70 en el ensayo de ELISA y el restante se utilizó para la determinación de proteína por el kit comercial del ácido bicinconínico (BCA, Sigma Aldrich). Se midió la absorbancia a 450 nm.

En el estudio estadístico se utilizó la "t" de Student para muestras independientes.

## RESULTADOS

En hígado (Fig. 1 A), los ratones ICR-CD1 adultos presentan menores niveles de Hsp70 que los maduros ( $p < 0,001$ ) y que los viejos ( $p < 0,05$ ). En la cepa Balb/C se observa la misma tendencia pero las diferencias no son estadísticamente significativas. En ambas cepas, los longevos tienen valores menores que los viejos ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , ICR/CD1 y Balb/c, respectivamente) y equiparables a los de adultos. Por el contrario, en corazón (Fig.1B), en la cepa Balb/c se observa una disminución ( $p < 0,001$ ) en maduros y en viejos ( $p < 0,01$ ) respecto al grupo de adultos, mientras que en la cepa ICR/CD1 las diferencias no son estadísticamente significativas. En ambas cepas, los longevos tienen mayores niveles que los viejos ( $p < 0,001$  y  $p < 0,01$ , ICR/CD1 y Balb/c, respectivamente) y semejantes a los de adultos.

En el riñón de ambas cepas, la médula renal (Fig. 2A) de adultos contiene menores niveles que en viejos ( $p < 0,01$  en la cepa Balb/C), niveles que están preservados en longevos. En cambio, la corteza renal (Fig. 2B) de adultos contiene mayores niveles que

en viejos, los cuales de nuevo están preservados en el grupo de edad longeva ( $p < 0,05$  en la cepa Balb/C).

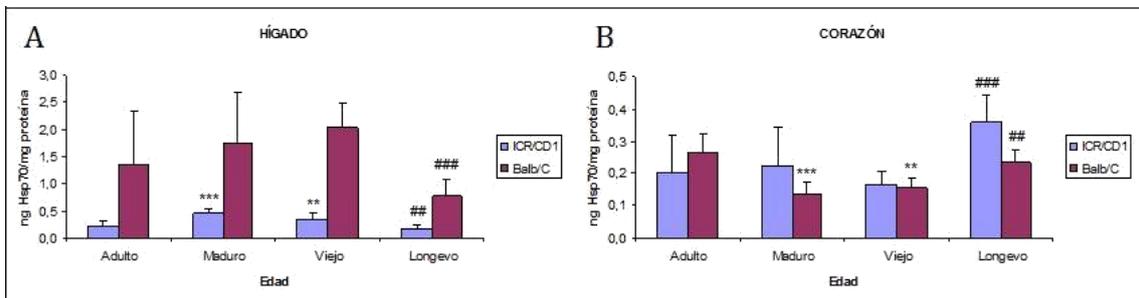


Figura 1. Niveles Hsp70 (ng/mg proteína) en hígado (A) y corazón (B) de ratones adultos, maduros, viejos y longevos de las cepas ICR-CD1 (azul) y Balb/C (morado). Las barras muestran la media y desviación estándar de los valores obtenidos en cada grupo de edad ( $n = 6-10$ ). \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  respecto al grupo de adultos; #:  $p < 0,01$ ; ###:  $p < 0,001$  respecto al grupo de viejos.

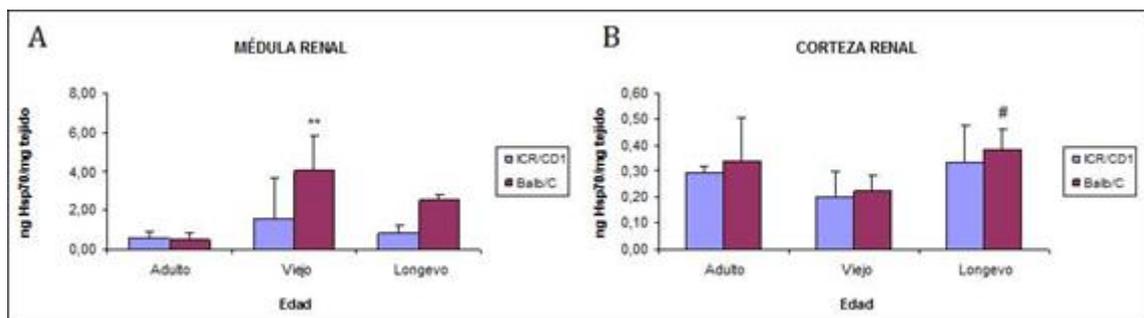


Figura 2. Niveles Hsp70 (ng/mg tejido) en médula (A) y corteza (B) renal de ratones adultos, viejos y longevos de las cepas ICR-CD1 (azul) y Balb/C (morado). Las barras muestran la media y desviación estándar de los valores obtenidos en cada grupo de edad ( $n = 5-7$ ). \*\*:  $p < 0,01$  respecto al grupo de adultos; #:  $p < 0,05$  respecto al grupo de viejos.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto un patrón en la variación de los niveles de Hsp70 con la edad diferente para los tejidos mitóticos (variación de los niveles en forma de “U” invertida) y postmitóticos (variación de los niveles en forma de “U”). El hígado es un órgano mitótico cuyas células (hepatocitos) se dividen durante toda la vida, mientras que el corazón, al ser un órgano post-mitótico, sus células (cardiomiocitos) desde las etapas iniciales de desarrollo entran en fase post-mitótica (G1) que dura toda la vida del organismo al que pertenecen. Del mismo modo, en riñón, la médula renal está constituida por células mitóticas mientras que la corteza renal lo está por células postmitóticas. Según la teoría de la oxidación del proceso de envejecimiento, el mismo se hace más evidente en células postmitóticas, que al no poder dividirse, manifiestan en mayor grado las consecuencias del estrés oxidativo en

sus estructuras (10). Por tanto, es lógico pensar que en estas células los mecanismos de protección serán distintos que en células mitóticas.

Los resultados del presente estudio muestran que la estrategia adaptativa de células postmitóticas supone el mantenimiento de elevados niveles basales de Hsp70, los cuales les permiten el correcto control permanente de la calidad proteica. Sin embargo, la síntesis de Hsp70 se ve afectada en el envejecimiento, detectándose menores niveles en ratones viejos, respecto al adulto. Esta disminución observada concuerda con otro estudio en el que se analizaron los niveles basales de Hsp70 en corazón de ratas de 3 y 24 meses de edad (11). Esta progresiva disminución de la síntesis asociada al envejecimiento en células postmitóticas podría suponer un mecanismo de control que dictaminase en última instancia la muerte de las mismas ya que puesto que no se dividen, la duración de su vida media, no está regulada por el número de divisiones (límite de Hayflick) sino por la acumulación de daño. De acuerdo con esto, aquellos sujetos que alcanzan la edad longeva, mantienen elevados los niveles basales de Hsp70 en células postmitóticas, tanto en corazón como en corteza renal.

Las células mitóticas, en cambio, tienen una expresión moderada de Hsp70. Dado que se dividen continuamente, son capaces de dividir sus proteínas mal plegadas en cada ciclo celular, por lo que la estrategia adaptativa de este tipo celular no supone el incremento de la expresión de Hsp70. Al envejecer, y como consecuencia del acúmulo de proteínas mal plegadas, los niveles basales de Hsp70 se ven aumentados en comparación con los de adultos. Estos mayores niveles de Hsp70 en los animales viejos, son el reflejo de la acumulación de proteínas dañadas que tiene lugar conforme el paso de los años (12). En longevos, los niveles de Hsp70 en células mitóticas son moderados y equiparables a los de adultos, lo que demuestra el envejecimiento saludable que ha mantenido este grupo de edad, que cursa con una menor acumulación de daño. Por tanto, los niveles basales de Hsp70 en células mitóticas reflejan el grado de estrés/daño celular, siendo mayores los niveles conforme es mayor la acumulación de proteínas dañadas, por lo que podrían ser utilizados como marcadores de envejecimiento.

El estudio de animales longevos supone una herramienta muy útil a la hora de comprender las causas del envejecimiento. Dentro de la misma especie, aquellos sujetos que logran alcanzar edades avanzadas, es debido al correcto mantenimiento del espacio homeodinámico (el cual se ve debilitado conforme el sujeto envejece) y con él, una efectiva respuesta al estrés. De acuerdo con esto, un estudio en ratones ICR-CD1 longevos (13), demostró que en dichos animales el control del estado redox así como una efectiva respuesta al estrés oxidativo, se encontraban preservados. En el presente estudio, la preservación de los niveles de Hsp70 en el grupo de longevos (equiparables a los niveles en el adulto) en órganos constituidos por células mitóticas y postmitóticas, reflejan la importancia de la Hsp70 como herramienta de defensa celular, permitiendo un envejecimiento saludable, el cual es el mecanismo clave para alcanzar una elevada longevidad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Martin E. Feder. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 1999. 61: 243–82.
2. Demand, J., Alberti, S., Patterson, C., Höhfeld, J. Cooperation of an ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Current Biology* 2011; 11 (20): 1569-1577.
3. Dice, J.F. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 2007; 3 (4): 295-299.
4. Demirovic, D.; Rattan, S.I.S. Establishing cellular stress response profiles as biomarkers of homeodynamics, health and hormesis. *Experimental Gerontology* 2013; 48 (1): 94-98.
5. Stuart K., Calderwood Ayesha., Murshid Thomas Prince. The Shock of Aging: Molecular Chaperones and the Heat Shock Response in Longevity and Aging –A Mini-Review. *Gerontology* 2009; 55: 550–558.
6. Soti, C., Csermely, P. Molecular chaperones and the aging process. *Biogerontology* 2000; 1: 225-233.
7. Mara A. Bonelli., Silvia Desenzani., Gabriella Cavallini., Alessio Donati., Antonello A. Romani., Ettore Bergamini., Angelo F. Borghetti. Low level caloric restriction rescues proteasome activity and Hsc70 level in liver of aged rats. *Biogerontology* 2008; 9: 1-10.
8. Calabrese, E. J., L. A. Baldwin. Defining hormesis. *Human and Experimental Toxicology* 2002; 21(2): 91-97.
9. Manzerra, P., Rush, S.J., Brown, I.R. Tissue-specific differences in heat shock protein hsc70 and hsp70 in the control and hyperthermic rabbit. *Journal of Cellular Physiology* 1997; 170: 130-137.
10. De la Fuente, M and Miguel, J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: The involvement of the immune system in Oxi-Inflamm-Aging. *Current Pharmaceutical Design* 2009; 15 (16): 3003-3026.
11. Colotti, C., Cavallini, G., Vitale, R.L., Donati, A., Maltinti, M., Del Ry, S., Bergamini, E., Giannessi, D. Effects of aging and anti-aging caloric restrictions on carbonyl and heat shock protein levels and expression. *Biogerontology* 2005; 6: 397-406.
12. Soti, C., Csermely, P. Aging and molecular chaperones. *Experimental Gerontology*

2003; 38: 1037-1040.

13. Vida, C., Rodríguez-Terés, S., Heras, V., Corpas, I., De la Fuente, M., González, E. The aged-related increase in xanthine oxidase expression and activity in several tissues from mice is not shown in long-lived animals. *Biogerontology* 2011; 12: 551-564.

Recibido: 17 marzo 2014.

Aceptado: 26 abril 2014.