

EL EFECTO ESTRESANTE DEL TABACO, ALCOHOL, SOBREPESO Y EXCESO DE EJERCICIO FISICO, ES MANIFESTADO A TRAVÉS DE LA EXPRESIÓN DE LA HSP70

STRESSING EFFECT OF CIGAR, ALCOHOL, OBESITY AND PHYSICAL EXERCISE IS MANIFEST TO THE EXPRESSION OF HSP70

Autores: Sergio Hugo Sánchez-Rodríguez *, Elena Donaji Ramírez-Alvarado **, Gerardo Enrique Barajas-Vásquez ***, César Salvador Cardona-Félix ****.

* Doctor en Ciencias (Fisiología). Departamento de Biología Celular. Unidad Académica de Biología Experimental. Universidad Autónoma de Zacatecas.

** Maestro en Ciencias (Biología). Departamento de Biología Celular. Unidad Académica de Biología Experimental. Universidad Autónoma de Zacatecas.

*** Maestro en Ciencias (Biología). Departamento de Biología Celular. Unidad Académica de Biología Experimental. Universidad Autónoma de Zacatecas.

**** Estudiante (Q.F.B.). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Zacatecas.

Correspondencia: Departamento de Biología Celular. Unidad Académica de Biología Experimental. Fernando Villalpando #80. Col. Ramón López Velarde. Guadalupe, Zacatecas, México. C.P. 98600. Tel/Fax (492) 921-13-26.

E-mail: smdck@hotmail.com.

Resumen

Para determinar el daño producido a nivel celular cuando existen factores estresantes, enfocamos el estudio a las proteínas de choque calórico (hsp), las cuales, son constituyentes normales de las células y su síntesis se incrementa con la exposición a varias formas de estrés. **Objetivo:** Determinar la expresión de las Hsp70 y 90 en linfocitos de individuos sanos, alcohólicos, obesos, fumadores y deportistas. Los linfocitos se obtuvieron por gradiente de Ficoll, se estresaron con luz ultravioleta y calor. Posteriormente se lizaron y caracterizaron las proteínas por PAGE-SDS, Western blot, y se inmunodetectaron con anticuerpos contra las Hsp. **Resultados:** Los linfocitos expresan constitutivamente las Hsp70 y 90, donde los individuos alcohólicos, fumadores y deportistas expresan más Hsp70 que los sanos y obesos; la Hsp90 se expresa más que la Hsp70 en condiciones basales, siendo mayor en individuos sanos, fumadores y deportistas. Al estresar a los linfocitos con luz ultravioleta se observó un incremento de la Hsp70 en los individuos Alcohólicos y deportistas, mientras que la Hsp90 es mayor en los individuos deportistas. Con estrés calórico, se observa un incremento de las Hsp70 y 90 en los individuos fumadores y alcohólicos, con una tendencia mayor de la Hsp90 en los individuos alcohólicos y una disminución en los individuos deportistas.

Palabras clave: Hsp, estrés, medio ambiente

Abstract

To determine the produced damage at cellular level when factor stressing exist, we focus the study to those heat shock proteins (Hsp), those which are constituent normal of the cells and their synthesis is increased with the exposition to several forms stress. **Objective:** Determine the expression of the Hsp70 and 90 in healthy individuals lymphocytes, alcoholic, obese, smokers and sport man. The lymphocytes was obtained by ficoll gradient, you stressing with ultraviolet light and heat. Subsequently you lysate and

characterized the proteins for PAGE-SDS, Western blot, and **immunodetected** with antibodies against those Hsp. **Results:** Lymphocytes express Hsp70 and 90 constitutively, where the alcoholic individuals, smokers and sport man express more Hsp70 that are healthy individuals and obese; Hsp90 is expressed more that Hsp70 in basal conditions being greater in healthy individuals, smokers and sport man. To stress those lymphocytes with ultraviolet light to observed a increment of the Hsp70 in the alcoholic individuals and sport man, while that Hsp90 is main in the sport man. With heat stress, to observe a increment of the Hsp70 and Hsp90 in smokers and alcoholic individuals, with a main tendency of the Hsp90 in alcoholic and a decrease in sport man.

Keywords: Hsp, stress, environment media

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos sufren del estrés ambiental, y los mas aptos se adaptan, concepto que conlleva a que la adaptación es una medida de ajuste de un individuo con su medio ambiente; es decir, que la adaptación es el grado en que los procesos metabólicos de un individuo se ajustan a las características del ambiente. ¹

De manera general, el termino estrés es usado en la fisiología para denotar lo contrario a bienestar. ² Así, se considera al estrés como el efecto de cualquier fuerza que tienda a extender cualquier proceso homeostático más allá de sus límites normales a cualquier nivel de organización biológica. ³

Se entiende que un estresor es un agente que evoca la respuesta patrón de estrés, siendo no solo de naturaleza física, sino que también puede ser emocional como el odio, el enojo o el temor entre otros. De hecho, la estimulación psicológica es uno de sus más frecuentes activadores. ⁴

El estrés puede ser climático, como un intenso frío o calor, nutricional, social o por enfermedad. ⁵ En términos ecológicos, el estrés resulta cuando los factores físicos, químicos y/o bióticos llevan a un organismo más allá de los límites de su nicho fundamental. ³

Las condiciones desfavorables en un organismo ya sea por el medio ambiente o por sus hábitos conductuales o por su dieta, son mediados a través de los sistemas nervioso y endocrino y, ayuda a los organismos a evadir el estrés. ⁶ El ajuste al estrés induce un amplio rango de cambios neuroendocrinos, psicológicos y de comportamiento, que permiten una rápida recuperación o adaptación necesaria para mantener la homeostasis interna. ^{7,8}

También se ha encontrado que un grupo de proteínas conocidas como proteínas de choque calórico (Hsp) o proteínas del estrés ayudan a los organismos a nivel celular a contrarrestar el estrés. ^{9,10,11,12,13,14} Las Hsp son inducidas por varios agentes estresantes, ^{15,16} entre los que están: la hipoglucemia, la anoxia, el calor, el etanol, el peróxido de hidrógeno, iones de metales pesados, arsenicales, infecciones con ciertos virus, ^{17,18} enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, ¹⁹ por privación de agua y alimento, ²⁰ la radiación ultravioleta, la radiación electromagnética de baja frecuencia, los campos intensos de radiación gamma ^{21,22} y los rayos gamma de baja intensidad. ²³

El medio ambiente es un factor estresante en todos los organismos, y en particular, el hombre debido a su estilo de vida, puede provocar más estrés a su organismo por los hábitos o adicciones durante su desarrollo. Los hábitos adversos

más conocidos son el alcoholismo, el tabaquismo, trastornos en la dieta, drogadicción (diversa), exceso de ejercicio, sedentarismo, etc.

En el presente proyecto se estudió qué mecanismos fisiológicos activan los individuos, que les permite adaptarse a diferente tipo de estrés como: ejercicio físico, obesidad y agentes químicos (tabaco y alcohol). Para ello, nos enfocamos al estudio de las proteínas de choque calórico Hsp70 y 90, ya que se expresa de manera normal en todos los organismos desde bacterias, levaduras y los humanos.^{13,24} La función de la Hsp70 es proteger a la célula del daño producido por el estrés, mediante la unión a proteínas parcialmente desnaturalizadas, disociando agregados de proteínas y regulando el doblado correcto y la traslocación intracelular de proteínas sintetizadas de novo.^{25,26} Así mismo, la función de la Hsp90 previene el agrupamiento de proteínas que están desplegadas durante el estrés y se asocian con receptores de hormonas esteroides para responder rápidamente a señales,²⁷ juegan un papel importante en la regulación de enzimas y en la transcripción de proteínas.²⁸ En general, la Hsp90 sirve como organizador que trae moléculas juntas y auxilia en sus ligaduras.²⁹

El objetivo del presente estudio fue: Determinar el grado de estrés que presentan los linfocitos de individuos deportistas, obesos, alcohólicos y fumadores a través de la expresión de las proteínas de estrés calórico Hsp70 y 90.

MATERIAL Y MÉTODOS

Individuos en estudio. Se seleccionaron individuos con una edad promedio de entre 18 a 22 años, sexo masculino. Se formaron 4 grupos de 4 miembros cada uno de acuerdo a su condición y hábitos (Fumadores, obesos, que ingerían alcohol de manera importante y los que hacían ejercicio físico intenso, así como un grupo de individuos sanos).

Obtención de linfocitos. Las muestras de sangre de los individuos en estudio fueron utilizados para aislar sus linfocitos. Se obtuvieron de cada individuo 10 ml de sangre periférica (Tubos vacutainer con heparina de 10 ml Beckton-Dickinson N.J., U.S.A.). De la sangre obtenida, los linfocitos fueron aislados por gradiente de Ficoll Histopaque (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, 1077-1) siguiendo la técnica descrita por Boyum (1968).³⁰ Los linfocitos de cada individuo, fueron cultivados en medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island NY, USA, 11876-026), suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 ng/ml de estreptomycin (In Vitro, México, D.F.), 0.08 U/ml de insulina (Eli Lilly México, D.F.) y 5% de Suero Fetal Bovino (Gibco BRL, Grand Island NY, USA, 16000-044). De cada individuo, la viabilidad de los linfocitos fue determinada al

momento de obtenerlos, mediante la técnica de exclusión con azul de tripano (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, T-6146).

Estrés celular. Los linfocitos de cada individuo en medio RPMI, se dividieron en 3 alícuotas. Una alícuota fue tomada como control para determinar el nivel basal de Hsp. otra fue sometida a estrés calórico en estufa de cultivo a 40°C durante 3 horas, y otra a luz UV utilizando una lámpara de luz UV-A (Black-Ray lamp UVL-56). La irradiación fue de 366 nm por 3 horas, cuya dosis final recibida fue de 5-30 mJ/cm².³¹ Después del estrés por calor y luz UV, la viabilidad de los linfocitos se volvió a determinar.

Lisis de los linfocitos y PAGE-SDS: Los linfocitos sometidos a estrés por UV y calor, se lavaron 3 veces con solución de fosfatos salinos (PBS; pH de 7.2) (Gibco BRL, Grand Island NY, USA, 21300-058), se le añadió 0.5 ml. de buffer de lisis que contiene: Triton X-100 al 1%, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.6 e inhibidor de proteasas 1 mM, PMSF (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, P-7626). El lisado se centrifugó por 10 minutos a 1600 g y el sobrenadante fue recuperado y se le determinó la concentración de proteínas.³² La cuantificación de proteína se realizó mediante la técnica descrita por Bradford (1976).³³ De cada condición experimental, 30 µg de proteína se caracterizaron en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS al 10%) de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970).³⁴

Western Blot e inmunodetección: Las proteínas en los geles de poliacrilamida-SDS fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (Amersham Laboratories, Buckinghamshire, England, RPN303C), como describió Towbin (1979).³⁵ Después, para identificar a las proteínas Hsp, el blot fue tratado con anticuerpos monoclonales específicos contra las proteínas Hsp70 y 90 (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, H-4149, H-5147) con una dilución 1:1000. Un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, A-9044) dilución 1:1500, es usado como segundo anticuerpo, seguido por un sistema de detección quimioluminiscente (ECL, RPN2106, Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, England), que fue detectado en una película radiográfica BioMax (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, USA, 870-1302) en un tiempo de 1 minuto.

Determinación de la cantidad de Hsp: Las autoradiografías obtenidas por el método de ECL se analizaron por densitometría (Eagle Eye, Estratagene Mitsubishi), con el fin de cuantificar la cantidad de proteína. El valor control (individuos sanos) fue restado de las condiciones de estrés (alcohol, tabaco, obesidad y ejercicio físico).

Análisis estadístico: Las bandas de proteína Hsp70 y 90 obtenida bajo las condiciones de estrés por alcohol, tabaco, obesidad y ejercicio físico fueron analizadas

por densitometría, los resultados obtenidos de esta, fueron expresados como media \pm s.e.m., donde n es el número de observaciones.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El estrés es un término amplio que implica la respuesta del cuerpo frente a una amenaza ante la cual necesita ajustarse.⁷ Uno de los mecanismos por los cuales las células de un organismo responden ante el estrés, son las proteínas de choque calórico.^{9,10,13,14,36} El punto central del presente estudio fue valorar el grado de estrés que presentan los linfocitos de individuos deportistas, obesos, alcohólicos y fumadores a través de la expresión de las proteínas de estrés calórico Hsp70 y 90.

Se encontró que los linfocitos obtenidos de los pacientes en estudio, expresan constitutivamente las Hsp70 y 90, en donde los individuos alcohólicos, fumadores y deportistas en condiciones basales expresan más Hsp70 que los sanos y obesos (figura 1), mientras que la Hsp90 se expresa mucho más que la Hsp70 en condiciones basales, siendo mas evidente en individuos sanos, fumadores y deportistas (figura 2). Es importante hacer notar que ambas Hsp70 y 90 se encuentran de manera basal en los linfocitos, ya que se sabe que su expresión en la mayoría de los organismos cumplen con las funciones características de protección celular, auxiliando en prevenir la desnaturalización de proteínas durante el estrés, en la traducción de proteínas y su doblado correcto, así como en la traslocación intracelular.^{10,37}

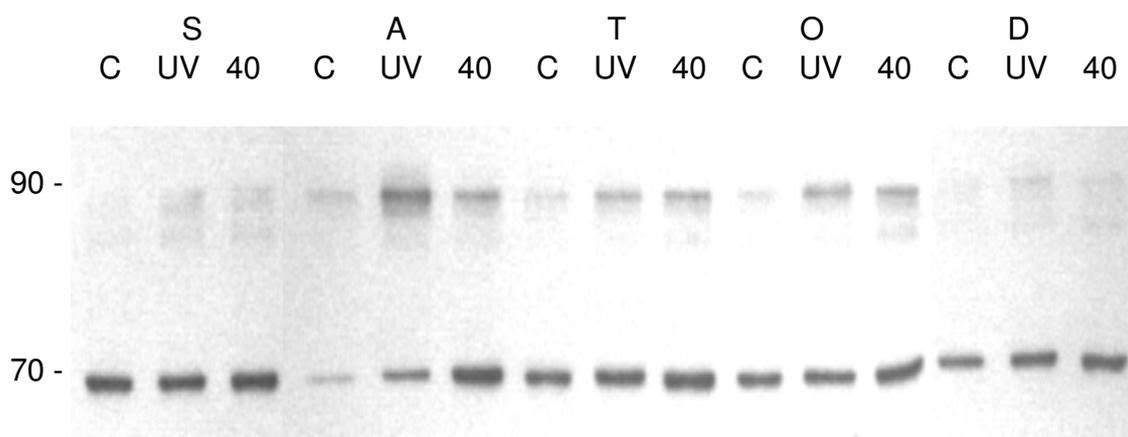


Figura 1. Expresión de Hsp70 y 90 en individuos sanos (S), alcohólicos (A), Fumadores (F), obesos (O) y deportistas (D). Las condiciones fueron: Control (C), estresados con luz UV, estresados con calor (40°C). PAGE-SDS

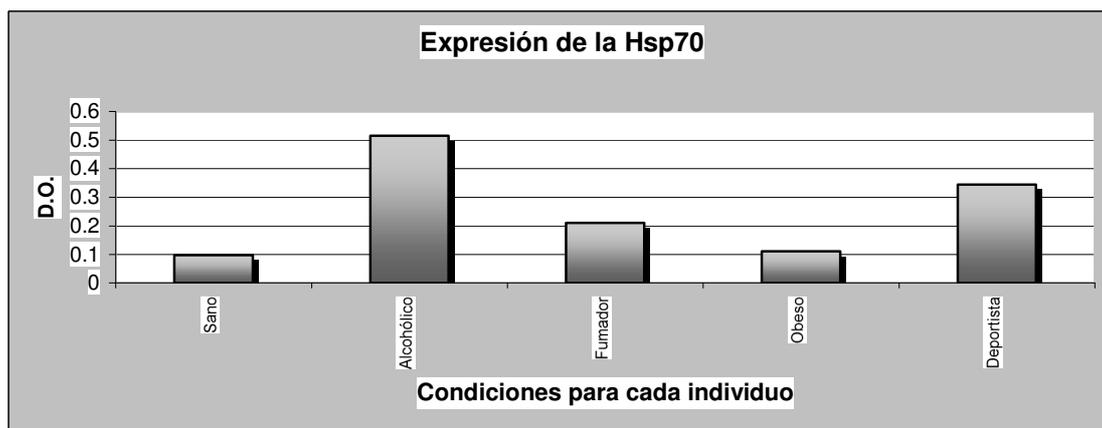


Figura 1. Expresión de la Hsp70 basal y/o constitutiva de linfocitos de pacientes sanos, fumadores, alcohólicos, obesos y deportistas. Densitometría de los controles obtenidos por PAGE-SDS.

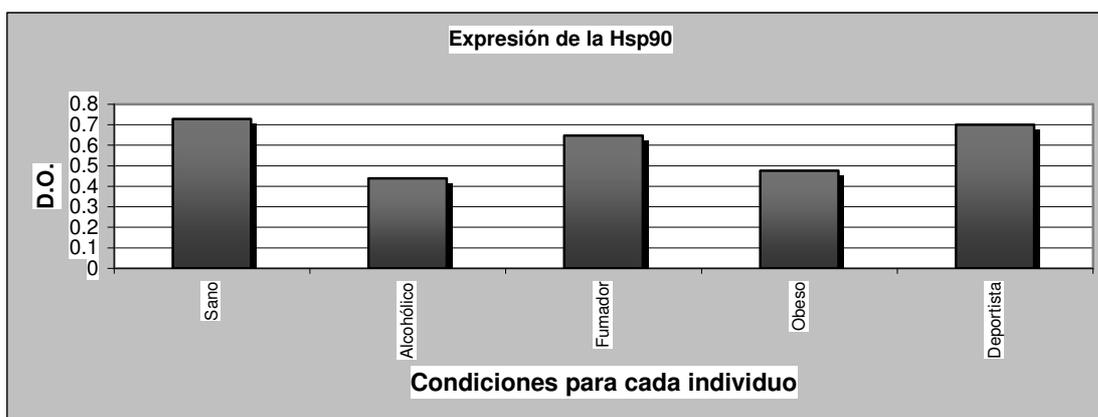


Figura 2. Expresión de la Hsp90 basal y/o constitutiva de linfocitos de pacientes sanos, fumadores, alcohólicos, obesos y deportistas. Densitometría de los controles obtenidos por PAGE-SDS.

Para despertar la respuesta celular de los linfocitos ante el estrés y medir su respuesta a través de la expresión de las Hsp, los linfocitos se estresaron con luz ultravioleta donde se observó un incremento en la expresión de las Hsp70 en los individuos Alcohólicos y deportistas, mientras que para la Hsp90 es mayor en los individuos deportistas (figura 3 y 4). Así mismo, en el presente estudio se utilizó como control el estresor calórico, ya que un inductor de la expresión de la hsp70.^{13,14,27} La respuesta de los linfocitos ante el calor, fue a través de la expresión de la Hsp70 y 90, las cuales fueron similares en individuos sanos, fumadores y obesos, con un incremento en individuos alcohólicos y deportistas (figura 3 y 4). Se conoce que una de las funciones de la hsp70 en condiciones de estrés, es unirse a péptidos y proteínas

dañadas para evitar su agregación, contribuyendo en su reparación y con ello proteger a la célula del agente estresor en cuestión.^{38,39}

Los resultados anteriores muestran que la expresión de las Hsp70 y 90 constitutivas y de nueva síntesis por inducción con luz ultravioleta y calor, se presentó en todos los linfocitos de los individuos en estudio, tanto de pacientes sanos como de individuos alcohólicos, obesos, fumadores y deportista, confirmando lo encontrado por otros autores que estas proteínas se sintetizan durante el estrés.⁴⁰

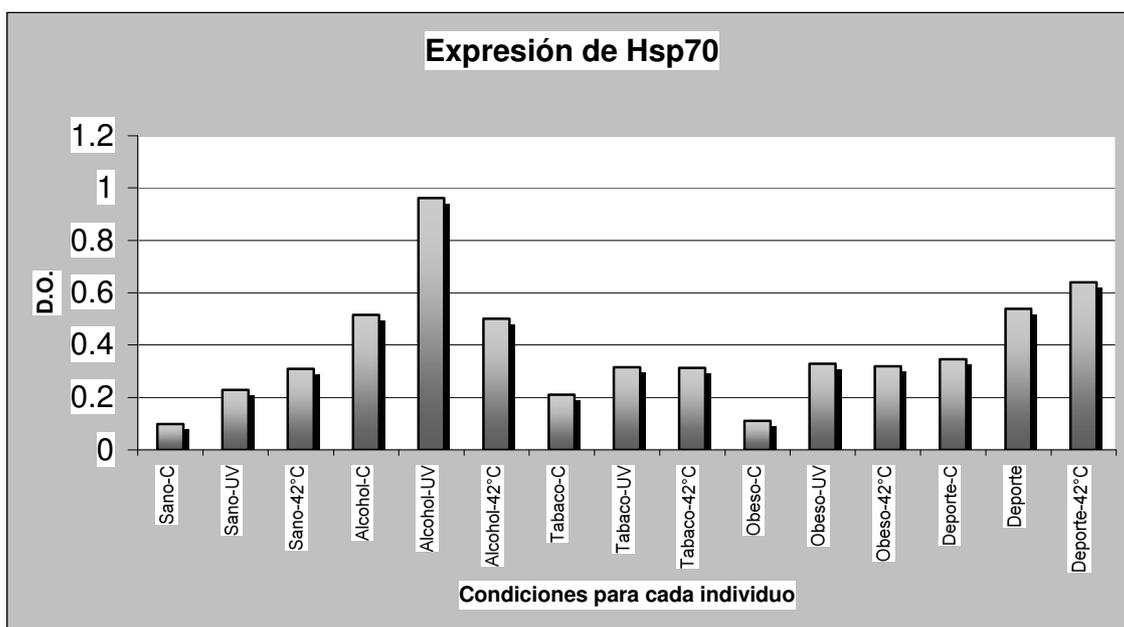


Figura 3. Expresión de la Hsp70 en linfocitos expuestos a luz ultravioleta y calor. Individuos sanos, alcohólicos, fumadores, obesos y deportistas. Densitometría del PAGE-SDS.

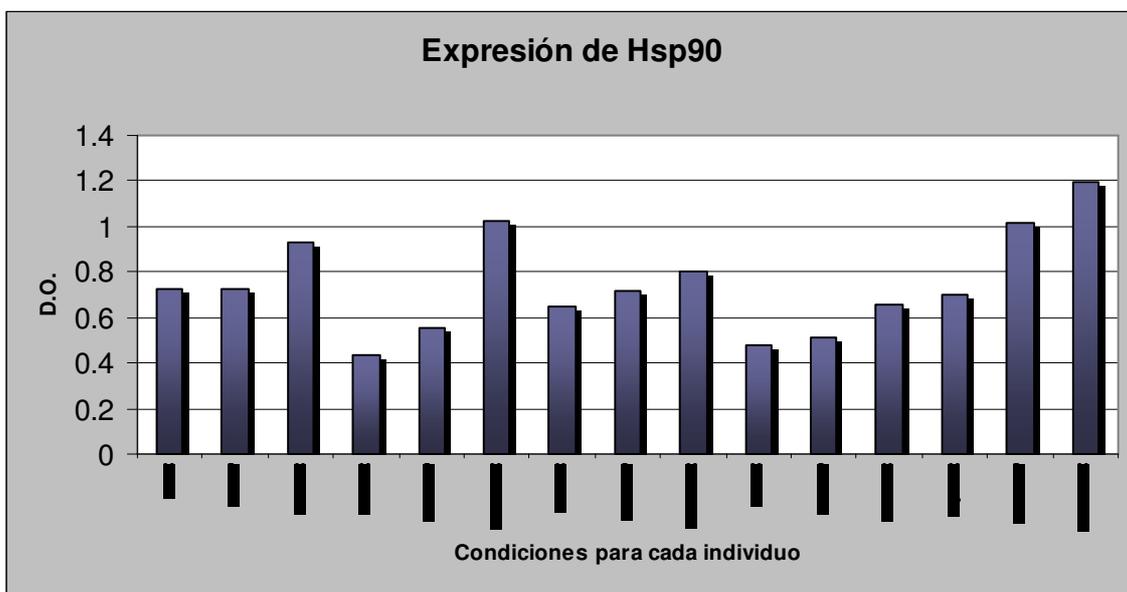


Figura 4. Expresión de la Hsp90 en linfocitos expuestos a luz ultravioleta y calor. Individuos sanos, alcohólicos, fumadores, obesos y deportistas. Densitometría del PAGE-SDS.

En el presente estudio cuando despertamos la respuesta con luz UV y calor en los linfocitos de individuos expuestos a los agentes estresantes como el alcohol, tabaco y ejercicio físico intenso, observamos una mayor síntesis de Hsp, lo que nos indica que los linfocitos de individuos expuestos a ciertos agentes estresantes desarrollan una respuesta mayor en la síntesis de Hsp. Este fenómeno ha sido visto en algunos organismos expuestos a un gran número de estresores como la temperatura, que los llevan a adquirir tolerancia a un amplio rango de agentes estresantes.⁴¹ Además, la Hsp70 es fundamental en el precondicionamiento a cierto agente estresante, debido a que la inducción de la Hsp70 se correlaciona con la protección a daños subsecuentes.^{17,42,43} La síntesis de proteínas Hsp es requerida de acuerdo a la temperatura o al estresor en cuestión y varía de una especie a otra.^{9,10}

En general, se observó un incremento en la síntesis de las proteínas Hsp70 y 90, indicándonos que estas proteínas ayudan a contrarrestar el estrés, ya que se ha visto, que la Hsp70 se encuentra en todos los organismos estudiados, desde bacterias, levaduras y el hombre, localizadas de manera ubicua en las células, cuya función principal es en el transporte y la unión a proteínas desdobladas y su corrección.⁴⁴ La Hsp70 fue la primera proteína observada como inducible por estresores como el calor entre otros.¹³ Se menciona que los organismos con tolerancia al calor expresan mayor cantidad de Hsp que un organismo menos tolerante.⁴⁵

Por otro lado, la Hsp90 pertenece a las chaperonas citosólicas constitutivamente más expresadas, particularmente en células eucarióticas,^{13,24} cuyas funciones son, prevenir el agregado de proteínas desnaturalizadas por temperatura, en la asociación a componentes celulares como los receptores de hormonas esteroideas,^{27,46,47} así mismo, juegan un papel importante en la regulación de enzimas y transcripción de proteínas en la célula.²⁸

Los linfocitos de individuos fumadores, alcohólicos y deportistas expresan más Hsp que los pacientes sanos (control) y obesos. Lo anterior tiene congruencia con otros trabajos donde se ha encontrado que existe una estrecha relación entre la expresión elevada de las Hsp y la expresión del citocromo P-450 durante el estrés por ejercicio, tabaquismo y alcoholismo. Durante el estrés, la expresión de las Hsp junto con el citocromo P-450 (CYP2E1: metaboliza compuestos policíclicos "dioxinas"), ayudan a contrarrestar el estrés.⁴⁸

El ejercicio al igual que otros agentes estresantes como la hipertermia, la isquemia, el estrés oxidativo, la disminución de glucosa y las modificaciones del calcio y pH, inducen la expresión de las Hsp en las células y tejidos.⁴⁹ En el presente estudio, encontramos un aumento de las proteínas Hsp70 y 90 en individuos que practican ejercicio, y esto correlaciona con lo reportado con otros autores que el ejercicio intenso y prolongado aumenta la síntesis de las Hsp en órganos como el corazón y el músculo esquelético.⁵⁰ Lo anterior se explica debido a que durante el ejercicio aumentan los radicales libres y le sigue un incremento en la expresión de enzimas antioxidantes y aumento en la expresión de las Hsp, indicando que un incremento del estado redox del músculo puede ejercer una señal de adaptación.^{51,52} El ejercicio induce la expresión de las Hsp influyendo beneficiosamente en la salud.^{50,53,54,55,56}

En general, las proteínas Hsp participan como mecanismo de resistencia al estrés, siendo común en todos los organismos, lo que les confiere la resistencia a un rango de estresores;^{6,41} es decir, que las altas temperaturas u otro tipo de agentes estresantes, ayudan a los organismos en condiciones futuras de estrés a tener una mayor resistencia. Lo anterior tiene relación con el hecho de que la tolerancia que presentan los organismos a un agente estresante, puede ser natural o inducida,³⁸ donde participa la síntesis de las Hsp como un mecanismo de respuesta celular.³⁶ La expresión de las Hsp varía dependiendo del estilo de vida que lleven los individuos, ayudando a contrarrestar el estrés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maddox J. Is Darwinism a thermodynamic necessity? *Nature*. 1991;350:653-658.
2. Lee DHK. Climatic stress indices for domestic animals. *Int J. Biometeorol.* 1965;9:29.
3. Spotila JR, Standora EA, Easton DP, Rutledge PS. Bioenergetics, behavior, and resource partitioning in stress habitats; Biophysical and molecular approaches. *Physiol. Zool.* 1989;62:253.
4. Selye H. The stress concept: Past, present and future. In: Cooper CL. Ed. *Stress Research*. John Wiley Sons, Ltd. 1983. pp. 12-16.
5. Stott GH. What is animal stress and how is it measured? *J. Anim. Sci.* 1981;52:150-153.
6. Hoffman AA, Parson PA. *Evolutionary genetics and environmental stress*. Oxford University Press, New York. 1991. pp-284.
7. Von Borell E. Neuroendocrine integration of stress and significance of stress for the performance of farm animal. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1995;44:219.
8. Bossy A. Fear and fearfulness in animals. *Q. Rev. Biol.* 1995;70:165-170.
9. Lindquist S. The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry.* 1986; 55:1151-1191.
10. Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-637.
11. Morimoto RI, Milaski KL. *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Pp:1-36. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1990. pp:332-359.
12. Welch WJ. *Stress Proteins in Biology and Medicine*, Morimoto RI, et al., (eds). Cold Spring Harbor Lab. Cold spring Harbor, New York. 1990. pp:223-278.
13. Hendrick JP, Harti FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry.* 1993;62:349-384.
14. Harti FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* 1996;381:571-580.
15. Ciocca DR, Oesterreich S, Chammess GC, McGuire WL, Fuqua SAW. Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27): a review. *Journal of National Cancer Institute.* 1993;85:1558-1569.
16. Lin H, Li H, Blank M, Head M, Goodman R. Magnetic field activation of protein-DNA Binding. *J Cellular Biochemistry.* 1998;70:279-303.

17. Guerreiro VJr, Raynes DA. Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from livestock. *J Anim Sci.* 1990;68:2779-2783.
18. Bañuelos-Valenzuela R, Sánchez-Rodríguez SH. La proteína de estrés calórico hsp70 funciona como un indicador de adaptación de los bovinos a las zonas áridas. *REDVET.* 2005;VI(3).
19. Villalobos-Hurtado R, Sánchez-Rodríguez SH, Avalos-Díaz E, Herrera Esparza R. Possibile ruolo di hsp70 nel trasporto di autoantigeni alla giunzione dermo-epidermica nel lupus eritematoso sistemico. possible role of hsp70 in autoantigen shuttling to the dermo-epidermal junction in systemic lupus erythematosus. *Reumatismo.* 2003;55(3):155-158
20. Barajas-Vásquez GE, Baldwin-Sevilla C, Barbosa-Cisneros OY, Sánchez-Rodríguez SH. Las proteínas de estrés calórico hsp60, 70 y 90 participan en la adaptación de los caprinos a las zonas áridas. *REDVET.* 2005;VI(3).
21. Saran M, Bors W. Radiation chemistry of physiological saline reinvestigated: evidence that chloride-derived intermediates play a key role in cytotoxicity. *Radiation Research.* 1997;147:70-77.
22. Feder EM, Hoffmann EG. Heat-Shock proteins, molecular Chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological physiology. *Annu Rev Physiol.* 1999;61:243-282.
23. Vega-Carrillo HR, Bañuelos-Valenzuela R, Manzanares-Acuña E, Sánchez-Rodríguez SH. Response of human lymphocytes to low gamma ray doses. *Alasbimn Journal.* 2001;3(12).
24. Nemoto T, Sato N. Oligomeric forms of the 90-kDa heat shock protein. *Biochemical Journal.* 1998;330:989-995.
25. Leppa S, Sistonen L. Heat shock response pathophysiological implications. *Annals of Medicine.* 1997;29:73-78.
26. Goodman R, Blank M. Magnetic field stress induces expression of Hsp 70. *Cell Stress & Chaperones.* 1998;3:79-88.
27. Pennisi E. Expanding the eucariotes cast of chaperones. *Research News Science.* 1996; 272:1613-1614.
28. Georgopoulos C, Welch WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annual Review of Biology.* 1993;9:601-634
29. Max R, Davie JR, Cox RP, Chuang DT. Molecular chaperones: heat shock proteins, foldases, and matchmakers. Review Article. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 1994;124:31-36.

30. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968;21:77.
31. Leverkus M, Yaar M, Eller MS, Tang EH, Gilchrist BA. Post-transcriptional regulation of UV induced TNF- α expression. *J Invest Dermatol.* 1998;110:353-7
32. Harlow E, Lane D. *Antibodies a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. 1988.
33. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976;72:248-254.
34. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London).* 1970;227:680-685.
35. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci.* 1979;76(9):4350-4354.
36. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C. *The biology of the heat shock proteins and molecular chaperones.* New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994. pp:610.
37. Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones.* 1996;1:109-115.
38. Parsell DA, Lindquist S. Heat shock proteins and stress tolerance. En: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.* Eds. RI Morimoto, A Tissieres, S Georgopoulos. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994. pp. 457-493.
39. Karlin S, Brocchieri L. Heat Shock Protein 70 Family: Multiple Séquence Comparisons, Function and Evolution. *J Molecular Evolution.* 1998;47:565-577.
40. Selvan S, Grewal PS, Leustek T, Gaugler R. Heat shock enhance thermotolerance if infective insect-parasitic nematodes *Heterorhabditis bacteriosphora.* (Rhabditidia: Heterorhabditidea). *Experientia.* 1996;52:727-730.
41. Pyza E, Mak P, Kramarz P, Laskowski R. Heat shock proteins (Hsp70) as biomarker in ecotoxicological studies. *Ecotoxicological and Environmental Safety.* 1997;38:244-251.
42. Donati Y, Slosman DO, Polla BS. Oxidative injury and the heat shock response. *Biochem Pharmacol.* 1990;32:104-113.
43. Turman MA, Kahn DA, Rosenfeld SL, Apple CA, Bates CM. Characterization of

- Human Proximal Tubular Cells after Hypoxic Preconditioning: Constitutive and Hypoxia-induced Expression of Heat Shock Proteins Hsp70 (A, B and C), Hsc70 and Hsp90. *Biochemical and Molecular Medicine*. 1997;60:49-58.
44. Kopecek P, Altmannova K, Weigl E. Stress Proteins: Nomenclature, division and functions. *Biomed. Papers*. 2001;145:39-47.
45. Krebs RA, Feder ME. Hsp70 and larval thermotolerance in *Drosophila melanogaster*: how much is enough and when is more too much? *Journal of Insect Physiology*. 1998;44:1091-1101.
46. Chang HJ, Nathan DF, Linqvist S. In vivo analysis of the Hsp90 co-chaperone Stil (p60). *Molecular Cell Biology*. 1997;17:318-325.
47. Csermely P, Schnaider T, Szántó D. Possible nuclear functions of the major molecular chaperones of the eukaryotic cytoplasm, Hsp90. *Current Science*. 1998;5:442-445.
48. http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/T7-cit_P450.pdf
49. Fehrenbach E, Niess AM. Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exerc. Immunol Rev*. 1999;5:57-77.
50. Locke M. The cellular stress response to exercise: role of stress proteins. *Exerc. Sports. Sci. Rev*. 1997;25:105-136.
51. Ji LL, Leeuwenburgh C, Leichtweis S, Gore M, et al. Oxidative stress and ageing. Role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann NY Acad Sci*. 1998;854:102-117.
52. McArdle A, Jackson MJ. Exercise, oxidative stress and ageing. *J. Anat*. 2000;197:539-541.
53. Salo DC, Donovan CM, Davies KJ. Hsp70 and others possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart and liver during exercise. *Fre. Rad. Biol. Med*. 1991;11:239-246.
54. Locke M, Tanguay RM, Ianuzzo CD. Enhanced post-ischemic myocardial recovery following exercise induction of Hsp72. *Am. J. Physiol*. 1995;267:H320-H325.
55. Skidmore R, Gutierrez JA, Guerreiro V, Kregel K. Hsp70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. *Am. J. Physiol*. 1995;268:R92-R97.
56. Fehrenbach E, Niess AM, Veith R, et al. Changes of Hsp27 expression in leukocytes are associated with adaptation to exercise under conditions of high environmental temperature. *J. Leukoc Biol*. 2001;69:747-754.