

## Efecto de un programa de ejercicio físico sobre la respuesta a proteínas mal plegadas en las células mononucleares de la sangre periférica de pacientes pediátricos con obesidad

Manuel Pérez-Pérez<sup>1</sup>, María José Cuevas<sup>1</sup>, Rocío Quiroga<sup>1,2</sup>, Marta Rivera-Villoria<sup>1</sup>, Susana Martínez-Flórez<sup>1</sup>, José Antonio de Paz<sup>1</sup>, Javier González-Gallego<sup>1</sup>, Brisamar Estébanez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biomedicina de la Universidad de León, Dpto. Ciencias Biomédicas, León, España

<sup>2</sup> Complejo Asistencial Universitario de León (CAULE), Servicio de Pediatría y Neonatología, León, España

### Resumen

La prevalencia de la obesidad infantil ha aumentado a nivel global de forma preocupante, especialmente por las consecuencias que se pueden manifestar en la edad adulta. Se ha demostrado que esta afección aumenta el estrés de retículo endoplásmico (ERE) y, por lo tanto, activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). El ejercicio físico es una de las principales propuestas para atajar este reto de salud pública y, específicamente, para resolver el ERE. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue la evaluación del efecto de un programa de entrenamiento combinado de fuerza y resistencia de 12 semanas sobre la UPR en células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de pacientes pediátricos obesos. Para ello, se distribuyeron aleatoriamente 12 niños obesos (9 – 11 años) en un grupo entrenado (GE, n = 8), que se sometió al protocolo de entrenamiento, y un grupo control (GC, n = 4), que mantuvo sus rutinas habituales. Se analizaron proteínas de la UPR (ATF4, ATF6 p50, BiP, CHOP, p-eIF2 $\alpha$ , p-IRE1 y XBP1s) por *Western Blot* antes y después del periodo de entrenamiento. Los resultados demostraron que el entrenamiento atenuó el aumento en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  e IRE1 en comparación con el GC. Además, se observó un efecto tiempo x grupo en la expresión de CHOP tras el entrenamiento. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la expresión de ATF4, ATF6 p50, BiP o XBP1 tras el periodo de entrenamiento. En conclusión, los resultados sugieren que el programa de entrenamiento promueve un alivio en el ERE de los pacientes pediátricos obesos. No obstante, se necesitan nuevas investigaciones para determinar la eficacia de programas de entrenamiento alternativos.

### Palabras clave

ejercicio, estrés de retículo endoplásmico (ERE), niños, obesidad, células mononucleares de la sangre periférica (PBMC), proteínas mal plegadas (UPR).

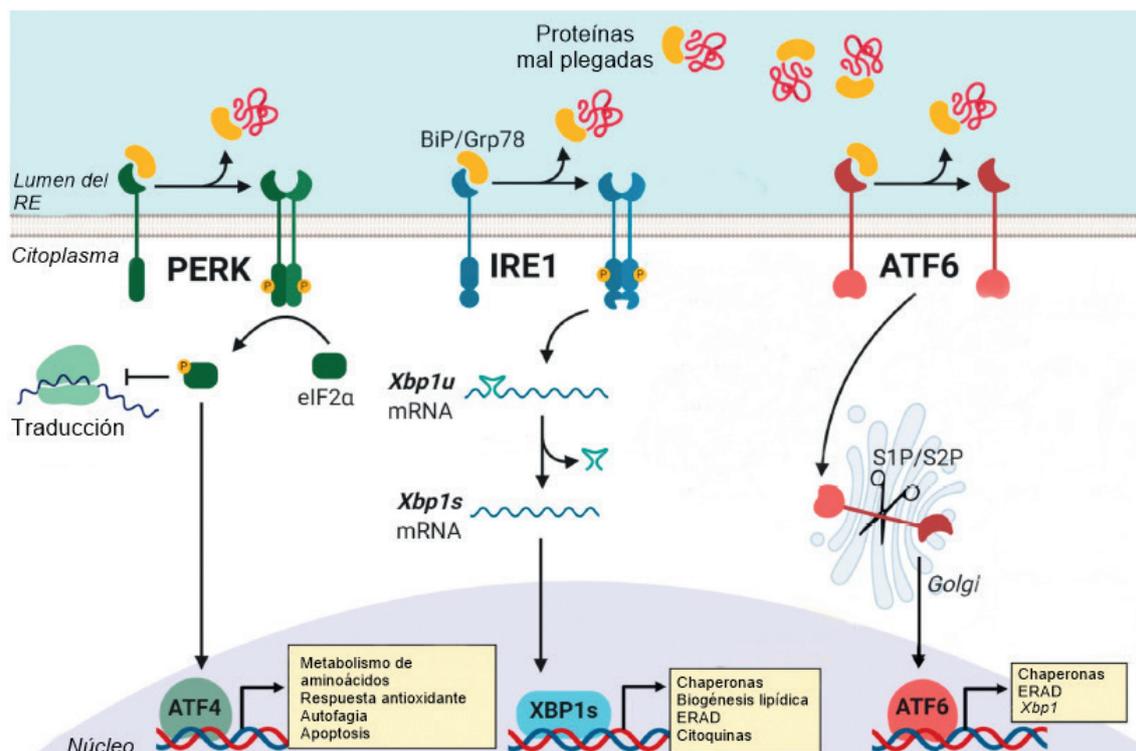
### Introducción

El aumento en la prevalencia de la obesidad infantil es uno de los problemas de salud pública más preocupantes del siglo XXI. La aparición de la obesidad durante la infancia aumenta las probabilidades de desarrollar enfermedades cardiovasculares o diabetes de forma precoz. Así, la prevención y tratamiento de la obesidad infantil se postula como uno de los grandes retos de la sociedad actual (Organización Mundial de la Salud, 2021).

La obesidad es responsable de diversas alteraciones a nivel celular como la acumulación de proteínas no plegadas o mal plegadas en el lumen del retículo

endoplásmico (RE), generando una situación conocida como estrés de RE (ERE) (Pagliassotti *et al.*, 2016). Las células alivian el ERE a través de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), tratando de restaurar la homeostasis del RE y, de no ser posible, induciendo la apoptosis (Hetz *et al.*, 2020). Esto se manifiesta en las células de los pacientes con obesidad en forma de una activación crónica de la UPR (Pagliassotti *et al.*, 2016).

La UPR puede activarse mediante tres vías (**Fig. 1**), cada una de ellas iniciada por una proteína transmembrana del RE: la quinasa de retículo endoplasmático de tipo proteína quinasa R (PERK), la enzima 1 $\alpha$  dependiente de inositol (IRE1) y el factor activador de transcripción 6 (ATF6). En condiciones normales, la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP o GRP78), una de las chaperonas más abundantes en el RE, mantiene inactivos a estos iniciadores de la UPR. Cuando, durante una situación de ERE, se incrementan los niveles de proteínas mal plegadas, BiP se une a ellas, activando a los iniciadores al liberarse de los mismos (Kopp *et al.*, 2019).



**Figura 1. Activación de la UPR.** La disociación de la chaperona BiP de PERK, IRE1 y ATF6 para unirse a las proteínas mal plegadas en una situación de ERE, induce la activación de las tres vías de señalización de la UPR. Los factores de transcripción activados en estas vías conducen a cambios en la expresión génica con el objetivo de restaurar la homeostasis. Figura modificada de Flores-Santibáñez *et al.* (2019).

La autofosforilación de PERK, desencadena la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 (eIF2 $\alpha$ ), reduciendo

la traducción proteica. A su vez, eIF2 $\alpha$  fosforilado induce la síntesis del factor de transcripción activador 4 (ATF4), que activa la expresión de genes implicados en la restauración de la homeostasis. La autofosforilación de IRE1 permite la síntesis de la forma activa de la proteína 1 de unión a X-box (XBP1), que también activa genes dirigidos a paliar el ERE. Por último, la activación de ATF6 supone su traslocación al aparato de Golgi, donde se escinde un fragmento activo de la misma (ATF6 p50) encargado de inducir la expresión de BiP, entre otros factores. Cuando no se consigue aliviar el ERE por medio de la UPR, se activan vías apoptóticas promovidas por la proteína homóloga de C/EBP (CHOP o GADD153), cuya expresión está, principalmente, inducida por ATF4 (Fernández *et al.*, 2015; Hetz *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que la práctica regular de ejercicio físico puede contribuir a la recuperación de la homeostasis de RE. Numerosos estudios (Da Luz *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2016; Khadir *et al.*, 2016) describen cómo, tras distintos programas de entrenamiento, los niveles de activación de la UPR en células de individuos obesos disminuyen acercándose a los de individuos normopeso, evidenciando una atenuación del ERE.

### Objetivo

El objetivo de este trabajo consistió en la evaluación de un entrenamiento de fuerza y resistencia de 12 semanas como agente terapéutico para atenuar el ERE en niños obesos mediante la UPR, algo que, en este grupo de población, a nuestro conocimiento, no se había probado hasta el momento. Específicamente, se investigó su capacidad para modificar los principales biomarcadores de la UPR (ATF4, ATF6 p50, BiP, CHOP, p-eIF2 $\alpha$ , p-IRE1 y XBP1s) en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de niños diagnosticados con obesidad.

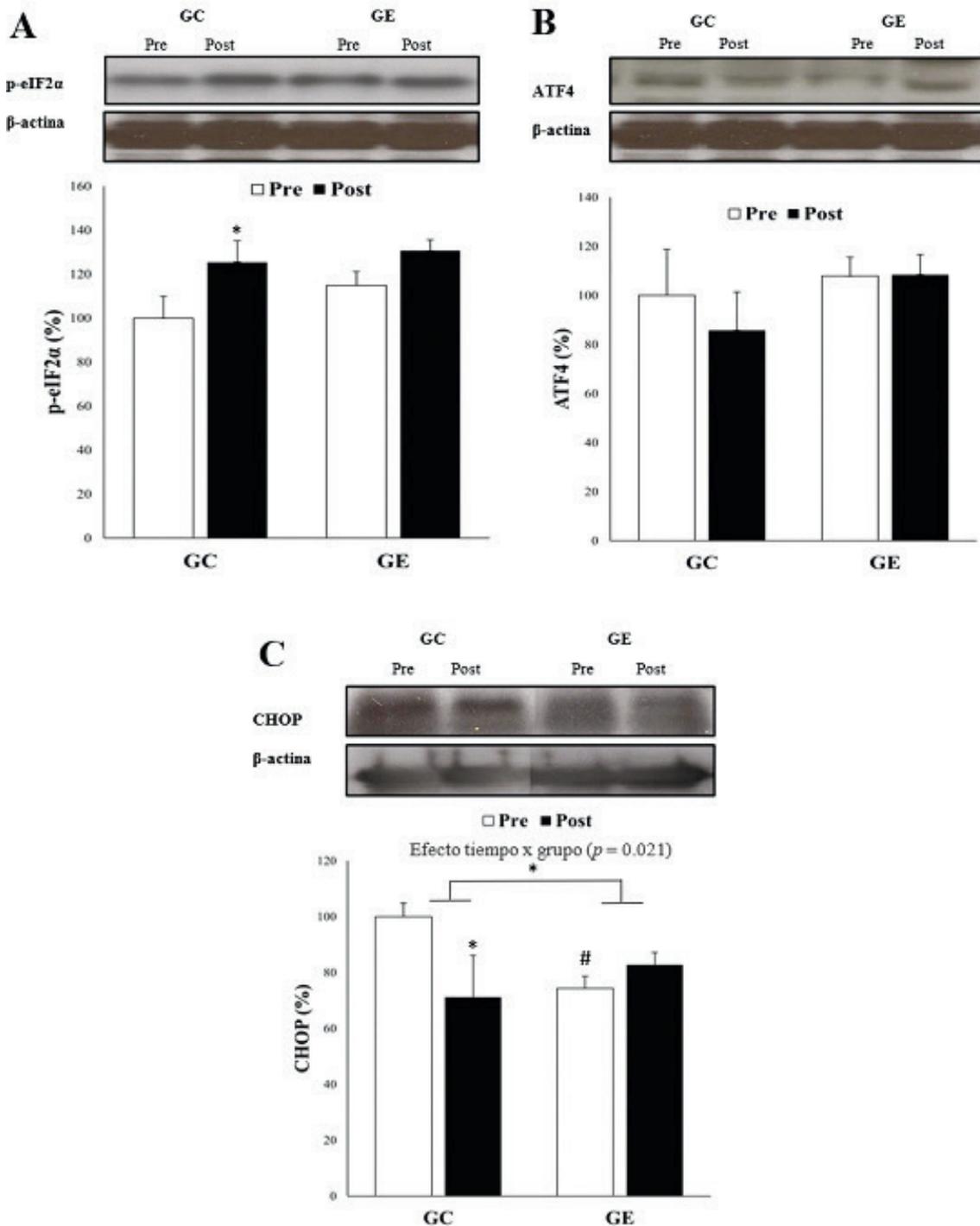
### Materiales y métodos

En el estudio participaron 12 niños diagnosticados con obesidad de entre 9 y 11 años del Servicio de Pediatría y Neonatología del Complejo Asistencial y Universitario de León (CAULE), divididos en 2 grupos aleatoriamente: un grupo control (GC; n = 4), en el que los niños no se someterían al programa de entrenamiento y mantendrían sus rutinas habituales, y un grupo de entrenamiento (GE; n= 8), en el que los niños completaron 30 sesiones de ejercicios combinados de fuerza y resistencia.

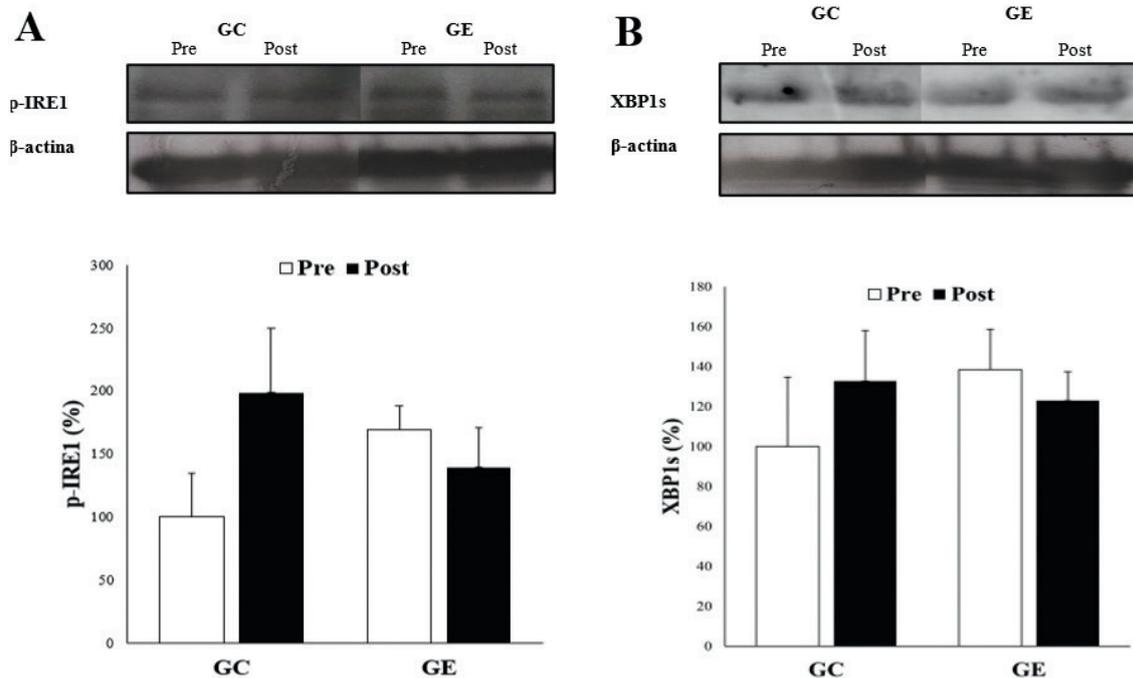
El diseño experimental constó de 14 semanas. El plan de entrenamiento se desarrolló en 2-3 sesiones semanales de 40 minutos cada una a lo largo de 12 semanas en las que se combinaron ejercicios de fuerza y resistencia. Durante la semana anterior y posterior al periodo de entrenamiento se tomaron muestras de sangre y se aislaron las PBMC mediante el procedimiento esquematizado en la **Figura 2**.

El análisis de expresión de las proteínas se llevó a cabo mediante *Western Blot*, relativizando la cuantificación proteica a la de la  $\beta$ -actina. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS versión 24 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.

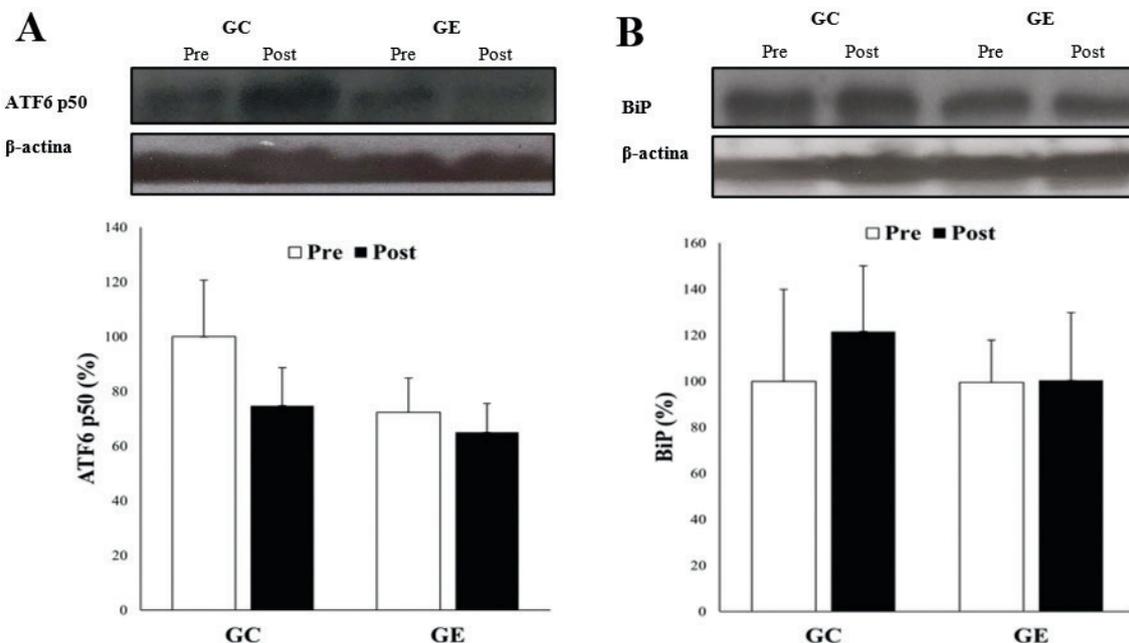




**Figura 3.** Cuantificación densitométrica y *Western Blots* representativos de p-eIF2 $\alpha$  (A), ATF4 (B) y CHOP (C) en las PBMC de niños obesos, antes (pre) y después (post) de un programa de entrenamiento de 12 semanas. Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM. \*Diferencias significativas con respecto al valor preentrenamiento del mismo grupo ( $p < 0,05$ ). #Diferencias significativas con el valor preentrenamiento del grupo control. Grupo control (GC) y grupo entrenado (GE).



**Figura 4.** Cuantificación densitométrica y *Western Blots* representativos de p-IRE1 (A) y XBP1s (B) en las PBMC de niños obesos, antes (pre) y después (post) de un programa de entrenamiento de 12 semanas. Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenado (GE).



**Figura 5.** Cuantificación densitométrica y *Western Blots* representativos de ATF6 p50 (A) y BiP (B) en las PBMC de niños obesos, antes (pre) y después (post) de un programa de entrenamiento de 12 semanas. Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenado (GE).

## Discusión

La obesidad provoca una situación crónica de ERE, conduciendo a una activación de la UPR (Pagliassotti *et al.*, 2016). Además, se ha puesto de manifiesto que el ejercicio físico a largo plazo tiene capacidad para atenuar esta activación de la UPR, evidenciando un alivio del ERE (Hong *et al.*, 2017). Por ello, en este estudio se evaluó la capacidad de un programa de entrenamiento para aliviar el ERE en las PBMC de niños con obesidad.

El aumento significativo en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en el GC, que no ocurre en el GE, sugiere que el entrenamiento podría estar evitando el aumento en la activación de esta vía. De un modo similar, Da Luz *et al.* (2011) y Cai *et al.* (2016), en estudios llevados a cabo en ratas obesas, observaron una reducción en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  tras distintos programas de entrenamiento, revirtiendo así la situación que se observaba en ratas obesas sedentarias con respecto a ratas normopeso y evidenciando un alivio del ERE.

El ejercicio físico puede potenciar la expresión de la proteína inducible por daño en el ADN y detención del crecimiento (GADD34) (Wu *et al.*, 2011), que participa en la desfosforilación de eIF2 $\alpha$  para restaurar la traducción (Nakka *et al.*, 2016). Así, la atenuación en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  podría deberse a un aumento en la expresión de GADD34 por el entrenamiento.

En cuanto a la expresión de ATF4, no se encontraron cambios significativos en ninguno de los grupos. Estudios como el de Kim *et al.* (2014) demuestran que la intensidad del ejercicio influye en la expresión de ATF4, por lo que la intensidad de este protocolo de entrenamiento podría no ser suficiente para modificar su expresión.

La obesidad está estrechamente vinculada con trastornos de autoinmunidad, ya que aumenta la secreción de algunas adipocinas inhibitoras de la apoptosis células inmunes (Baranowska-Bik y Bik, 2020). Es posible que este hecho pueda provocar una disminución en la expresión de CHOP en las PBMC del GC, desregulando la respuesta inmunitaria al dificultar la apoptosis. En esta línea, los resultados obtenidos para el GE podrían sugerir una mayor regulación de la respuesta inmune tras el entrenamiento.

Además, se ha visto que, en macrófagos, vías inflamatorias como la señalización por receptores de tipo *Toll* (TLR) inhiben la expresión de ATF4, provocando que su diana, CHOP, se exprese también en menor cantidad (Grootjans *et al.*, 2016). En concreto, la expresión TLR4 se encuentra disminuida en células inmunes de humanos obesos sometidos a programas de entrenamiento (Robinson *et al.*, 2015). De forma similar, en un estudio previo realizado sobre los propios pacientes del presente trabajo, se determinó que el protocolo de entrenamiento inhibió significativamente la activación de la vía inflamatoria del receptor de tipo Nod con dominio de pirina 3 (NLRP3), asociada a la obesidad (Quiroga *et al.*, 2020). Por consiguiente, el ejercicio está mitigando la respuesta inflamatoria en el GE, lo que provoca una atenuación de la regulación negativa sobre CHOP.

Adicionalmente, se ha visto que el ejercicio físico puede promover la autofagia (Andreotti *et al.*, 2020), un proceso capaz de inducir la expresión de CHOP (Altman *et al.*, 2009), lo que también podría evitar el descenso observado en el GC.

De la misma manera que p-eIF2 $\alpha$ , el protocolo de ejercicio parece atenuar el aumento en la fosforilación de IRE1 observado en el GC (aunque de forma no significativa). De hecho, diversos estudios reportan un descenso paralelo en los niveles de fosforilación de ambas proteínas tras protocolos de entrenamiento (Cai *et al.*, 2016; Khadir *et al.*, 2016), lo que implicaría un alivio del ERE mediado por el ejercicio físico. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de XBP1s en ninguno de los grupos, al igual que en estudios previos (Deldicque *et al.*, 2013).

Por último, los niveles de ATF6 p50 y los de su diana transcripcional BiP no se vieron afectados por el entrenamiento. En este mismo sentido, en un estudio con PBMC de ancianos, la expresión de ATF6 permaneció inalterada pese al entrenamiento (Estébanez *et al.*, 2019).

### Conclusiones

En este estudio se detectó un aumento en la activación de la UPR en el GC, evidenciado por un aumento en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  e IRE1, mientras que el protocolo de ejercicio implementado atenuó esta respuesta en el GE. Esto sugiere que el programa de entrenamiento es capaz de promover la restauración de la homeostasis del RE, aliviando el estado de ERE en las PBMC de niños con obesidad. Los resultados obtenidos son consistentes con la literatura existente hasta este momento, aunque todavía no existiesen evidencias para el caso concreto de niños obesos.

Sin embargo, en otras proteínas de la vía no se aprecian variaciones considerables. Por otro lado, en el caso de CHOP, se observa justo el efecto contrario, aunque esto podría ser explicado atendiendo a procesos inflamatorios que disminuyen su expresión y que son atenuados como consecuencia del protocolo de entrenamiento o procesos de autofagia promovidos por el ejercicio físico y que potenciarían su expresión.

### Bibliografía

- Altman, B. J., Wofford, J. A., Zhao, Y., Coloff, J. L., Ferguson, E. C. *et al.* 2009. Autophagy provides nutrients but can lead to chop-dependent induction of bim to sensitize growth factor-deprived cells to apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 20(4):1180–1191.
- Andreotti, D. Z., Silva, J. do N., Matumoto, A. M., Orellana, A. M., de Mello, P. S. y Kawamoto, E. M. 2020. Effects of physical exercise on autophagy and apoptosis in aged brain: human and animal studies. *Frontiers in Nutrition*, 7:94.
- Baranowska-Bik, A. y Bik, W. 2020. The association of obesity with autoimmune thyroiditis and thyroid function - Possible mechanisms of bilateral interaction. *International Journal of Endocrinology*, 8894792.
- Cai, M., Wang, H., Li, J. J., Zhang, Y. L., Xin, L. *et al.* 2016. The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57:347-359.

- Da Luz, G., Frederico, M. J. S., Da Silva, S., Vitto, M. F., Cesconetto, P. A. *et al.* 2011. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *European Journal of Applied Physiology*, 111(9):2015-2023.
- Deldicque, L., Cani, P. D., Delzenne, N. M., Baar, K. y Francaux, M. 2013. Endurance training in mice increases the unfolded protein response induced by a high-fat diet. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(2):215-225.
- Estébanez González, B. 2016. Estudio de la interacción autofagia-inflamación-apoptosis en ancianos que participan en un entrenamiento de fuerza. Trabajo Fin de Máster, Universidad de León, España.
- Estébanez, B., Moreira, O. C., Almar, M., de Paz, J. A., González-Gallego, J. y Cuevas, M. J. 2019. Effects of a resistance-training programme on endoplasmic reticulum unfolded protein response and mitochondrial functions in PBMC from elderly subjects. *European Journal of Sport Science*, 19(7):931-940.
- Fernández, A., Ordóñez, R., Reiter, R. J., González-Gallego, J. y Mauriz, J. L. 2015. Melatonin and endoplasmic reticulum stress: Relation to autophagy and apoptosis. *Journal of Pineal Research*, 59(3):292-307.
- Flores-Santibáñez, F., Medel, B., Bernales, J. I. y Osorio, F. 2019. Understanding the role of the unfolded protein response sensor IRE1 in the biology of antigen presenting cells. *Cells*, 8(12):1563.
- Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R. J. y Blumberg, R. S. 2016. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 16(8):469-484.
- Hetz, C., Zhang, K. y Kaufman, R. J. 2020. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(8):421-438.
- Hong, J., Kim, K., Kim, J.-H. y Park, Y. 2017. Role of endoplasmic reticulum stress, autophagy, and inflammation in cardiovascular disease, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 4:29.
- Khadir, A., Kavalakatt, S., Abubaker, J., Cherian, P., Madhu, D. *et al.* 2016. Physical exercise alleviates ER stress in obese humans through reduction in the expression and release of GRP78 chaperone. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 65(9):1409-1420.
- Kopp, M. C., Larburu, N., Durairaj, V., Adams, C. J. y Ali, M. M. U. 2019. UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor. *Nature Structural and Molecular Biology*, 26(11):1053-1062.
- Nakka, V. P., Prakash-babu, P. y Vemuganti, R. 2016. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and autophagy: potential therapeutic targets for acute CNS injuries. *Molecular Neurobiology*, 53(1):532-544.
- Organización Mundial de la Salud. 2021. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/> (Acceso 25/7/2021).
- Pagliassotti, M. J., Kim, P. Y., Estrada, A. L., Stewart, C. M. y Gentile, C. L. 2016. Endoplasmic reticulum stress in obesity and obesity-related disorders: An expanded view. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 65(9):1238-1246.

- Quiroga, R., Nistal, E., Estébanez, B., Porras, D., Juárez-Fernández, M., Martínez-Flórez, S., García-Mediavilla, M. V., de Paz, J. A., González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S. y Cuevas, M. J. 2020. Exercise training modulates the gut microbiota profile and impairs inflammatory signaling pathways in obese children. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(7):1048-1061.
- Robinson, E., Durrer, C., Simtchouk, S., Jung, M. E., Bourne, J. E., Voth, E. y Little, J. P. 2015. Short-term high-intensity interval and moderate-intensity continuous training reduce leukocyte TLR4 in inactive adults at elevated risk of type 2 diabetes. *Journal of Applied Physiology*, 119(5):508-516.
- Wu, J., Ruas, J. L., Estall, J. L., Rasbach, K. A., Choi, J. H. *et al.* 2011. The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1 $\alpha$ /ATF6 $\alpha$  complex. *Cell Metabolism*, 13(2):160-169.