



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Las Proteínas de Choque Térmico Participan en
la Progresión del Cáncer y son Blancos de
Nuevas Inmunoterapias Antineoplásicas**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE
ACTUALIZACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

VIOLETA RAYÓN ESTRADA



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente	<i>Dra. Ana María Vázquez Álvarez</i>
Vocal	<i>Dr. Fernando García Tamayo</i>
Secretario	<i>Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez</i>
1°. Suplente	<i>Dr. Jorge Fernando Paniagua Solís</i>
2°. Suplente	<i>M en C. María de Lourdes Mayet Cruz</i>

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Farmacología.

Facultad de Medicina. U N A M

Asesor del tema

Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez

Sustentante

Violeta Rayón Estrada

Dedicatoria

A mi mamá Norma, por creer siempre en mí y nunca abandonar su fe en mi superación. Por tu cariño y apoyo incondicionales. Eres mi ejemplo de superación personal y mi más grande apoyo.

A mi papá Mario Alfonso, por inculcarme que la vida merece ser vivida con entusiasmo. Por tu cariño, tus consejos y dulzura.

A Ete, mi querida abuelita, por enseñarme que siempre se puede salir adelante y porque en tu rostro siempre encontré una sonrisa y muchísimo cariño.

A mi hermana Gaby, por su cariño y gran apoyo, por ser mi mejor amiga, aliada y confidente. Por no juzgarme nunca y siempre alentarme a seguir mis sueños. Sé que juntas tenemos la fortaleza suficiente para superar cualquier obstáculo.

A mi tío Marco Antonio, por su entusiasta disponibilidad, ganas de ayudar y cariño.

A mis tíos Félix, Rita, Ita y Fermín, por apoyarnos en las buenas y en las malas, y por siempre brindarnos su cariño y solidaridad.

A mis tíos Vicente y Paulita, por estar siempre al pendiente de nosotros.

A David, por su gran cariño, apoyo y entusiasmo.

A Diana, por ser mi amiga de toda la vida, compañera en mis aventuras, por su cariño, compañía y comprensión.

A Gabu, Bere y Vicky, por su apoyo, cariño y entusiasmo. Ustedes siempre fueron el mejor equipo para compartir conmigo todos esos ratos de trabajo y de ocio.

A mis amigos, porque siempre estuvieron conmigo, apoyándome y haciendo de cada momento una fiesta.

Agradecimientos

A mi asesor, el Dr. Marco Velasco Velásquez por su apoyo, orientación e infinita paciencia.

A mis sinodales, por sus valiosos comentarios sobre el presente trabajo y su aprobación.

A mis maestros porque ustedes son la piedra angular de nuestra educación, nuestros consejeros y aliados.

A mi mamá Norma Estrada, por tus consejos durante la edición de este trabajo.

A la UNAM, mi casa fuera de casa, a quien le debo mi preparación y le prometo poner siempre su nombre en alto.

A la Facultad de Química por mi excelente formación, la oportunidad de conocer otras culturas y por brindarme todos los recursos necesarios en mi carrera.

ÍNDICE

PÁG.

Resumen	9
1. Introducción	12
2. Objetivo	14
3. Metodología	14
4. Generalidades de las Proteínas de Choque Térmico (Hsp)	15
4.1. Clasificación	16
4.2. Estructura y Función Molecular	18
4.3. Expresión de Hsp e Inducción de la Respuesta al Choque Térmico (HSR)	22
4.3.1. Hsf como Sensor del Estrés Celular	25
4.3.2. Transcripción de Hsp Mediada por Hsf	26
4.4. Papel de las Hsp en la Respuesta ante el Estrés Celular	29
4.4.1. Función de las Hsp como Chaperonas	30
4.4.2. Regulación del Citoesqueleto	32
4.4.3. Reacción ante el Estrés Oxidativo	35
4.4.4. Regulación de la Apoptosis	35
4.5. Relevancia Clínica de las Hsp	41

5. Papel de las Hsp en el Cáncer	42
5.1. Correlación entre los Niveles de Hsp y Diferentes Tipos de Cáncer	42
5.2. Las sHsp como Promotoras del Cáncer	44
5.3. Factores Promotores del Cáncer: Hsp70 y Hsp90	46
5.4. Resistencia a Fármacos Antineoplásicos Conferida por sHsp	50
5.5. Terapias Antineoplásicas que Utilizan Inhibidores de Hsp	54
6. Las Hsp en Inmunoterapia	58
6.1. Antígenos Tumorales como Inductores de la Respuesta Inmune	58
6.1.1. Células del Sistema Inmune que Reconocen Antígenos Tumorales	60
6.2. Evasión de Células Neoplásicas al Sistema Inmune	61
6.3. Estrategias Utilizadas en la Inmunoterapia del Cáncer	62
6.4. Participación de las Hsp en la Respuesta Inmune	65
6.4.1. Estimulación del Sistema Inmune Innato por Hsp	66
6.4.2. Inmunidad Adaptativa	71
6.4.3. Inmunización con Extractos de Tumor	75
6.4.4. Inmunización con Hsp70 y gp96	77

6.5. Incremento del Potencial Inmunogénico de Varias Hsp a través de Modificación Genética	80
6.5.1. Contacto de las Hsp con Células del Sistema Inmune	81
6.5.2. Creación de Hsp70 y gp96 Membranal y Secretado por Medio de Ingeniería Genética	85
7. Discusión	89
8. Conclusiones	93
Referencias	95
Apéndices	124
a) Abreviaturas	124
b) Glosario	126

Resumen

Con el mejor entendimiento del cáncer a nivel molecular, se han identificado moléculas clave en la supervivencia y progresión de células cancerosas. Entre ellas se encuentran las proteínas de choque térmico (Hsp), un grupo de proteínas de estructura altamente conservada cuya transcripción es activada en respuesta a diversos tipos de estrés celular. En células sanas la función principal de las Hsp es la de chaperonas que al unirse a proteínas desnaturalizadas previenen la formación descontrolada de agregados proteicos en la célula. La actividad de chaperona de las Hsp depende de la plasticidad de su estructura cuaternaria, pues deben unirse a diversas proteínas blanco de conformación variable. La expresión de Hsp puede ser alterada durante la respuesta a diferentes estímulos: estrés oxidativo, metales pesados, análogos de amino ácidos, estrés osmótico, venenos metabólicos, choque por calor, agentes quimioterapéuticos, escasez de nutrientes, radiación ultra violeta y factor de necrosis tumoral (TNF).

Sin embargo, en los mamíferos algunas Hsp son expresadas de manera constitutiva en determinadas estirpes celulares, ayudando a mantener el estado de homeostasis facilitando el transporte, plegamiento y ensamblaje de polipéptidos. Además de la actividad de chaperona, las funciones principales de las Hsp durante el estrés celular consisten en inhibir:

- El acoplamiento de los microfilamentos previniendo la adición de monómeros de actina.

- El proceso de apoptosis, modulando las cascadas intrínseca y extrínseca a través de una regulación negativa en uno o más puntos en múltiples cascadas de señalización.

Se ha observado que las Hsp se encuentran sobreexpresadas en enfermedades neurodegenerativas y cáncer, padecimientos que se caracterizan por una alta acumulación intracelular de proteínas dañadas, generadas por medio de mutaciones y procesos de inflamación, isquemia y/o heridas. En el caso del cáncer se ha observado que la principal función de las Hsp es la de interactuar y regular la actividad de múltiples factores de transcripción, moléculas señalizadoras y cinasas.

Varios tipos de células tumorales expresan niveles altos de Hsp, lo que sugiere que una cantidad elevada de chaperonas moleculares se puede asociar al estado neoplásico. Es posible que altos niveles de Hsp le confieran resistencia a las células tumorales contra las defensas del organismo y agentes quimioterapéuticos. Además, la sobre-expresión de las Hsp se puede correlacionar con el grado de diferenciación de ciertos tejidos y con la malignidad del cáncer, por lo que, la presencia de algunas Hsp puede ser utilizada como un indicador útil en la predicción de la respuesta a diversos tratamientos antineoplásicos. Se sabe que las Hsp están involucradas, como reguladores del citoesqueleto, en la migración celular, de manera que podrían participar en el aumento en el potencial metastático.

Recientemente se ha encontrado que las Hsp pueden desencadenar reacciones inmunes, tanto las provenientes de bacterias como las extraídas de tumores, ya que son capaces de desencadenar reacciones específicas e

inespecíficas. Las Hsp que acarrean péptidos antigénicos, a través de su unión con diversos receptores, son fagocitadas al interior de las células presentadoras de antígeno (APC). Esto ocasiona:

- La secreción de citosinas proinflamatorias,
- El procesamiento del péptido contenido en el interior de las Hsp para su montaje en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y,
- La localización en la membrana de moléculas co-estimuladoras de linfocitos T y B.

En conjunto, los eventos mencionados promueven la activación de una respuesta celular y abren paso al uso de Hsp en el desarrollo de nuevas terapias que desencadenan una respuesta inmune contra tumores. Mientras que algunas terapias se basan en la introducción de Hsp extraídas de tumores autólogos, otras proponen el uso de terapias génicas para estimular la localización en membrana o secreción de las Hsp. Hasta ahora, estas terapias han demostrado ser útiles en el tratamiento de tumores pequeños y en la eliminación de micrometástasis.

1. Introducción

A pesar de la investigación que se ha realizado en cáncer, aún existe la gran necesidad de hallar nuevas formas de terapia. En los últimos años, los esfuerzos de muchísimos investigadores se han enfocado a obtener un mejor entendimiento del desarrollo de cáncer a nivel molecular, con la esperanza de que esto permita desarrollar terapias específicas y selectivas capaces de causar remisión sin recaída.

Los enfoques actuales buscan crear nuevos tratamientos que incluyan terapias génicas e inhibidores enzimáticos. Las primeras se basan en el empleo de plásmidos dirigidos por medio de virus modificados que se replican y eliminan en forma selectiva células tumorales, y; las segundas en la inhibición de diversas enzimas involucradas en las cascadas de supervivencia celulares. Estas últimas incluyen el uso de péptidos modificados (Hupp et al., 1995), oligonucleótidos antisentido (Chen et al., 1999) y moléculas pequeñas (Foster et al., 1999) que ayudan a restaurar la función de las proteínas supresoras de tumores alteradas. A pesar de que se han comprobado eficaces, estos tratamientos poseen varias limitantes:

- Problemas para hacer que los fármacos y virus lleguen al tumor y,
- Falta de selectividad hacia células tumorales (Rehman et al., 2005).

No obstante que desde hace seis décadas se descubrió que las células derivadas de tumores exógenos son inmunogénicas (Gross, 1943), la posibilidad de emplear al sistema inmune como una herramienta útil en el combate de carcinomas parecía remota, debido a que este hallazgo no había sido relacionado con el desarrollo de terapias antineoplásicas. A

medida que se han ido revelando los procesos más complejos del desarrollo del cáncer, así como de la regulación del sistema inmune, se tiene una mayor esperanza de lograr tratamientos que aumenten la potencia de este sistema contra células neoplásicas. Este esfuerzo podría generar terapias menos tóxicas que las existentes, o bien que ayuden a disminuir las dosis de fármacos quimioterapéuticos empleados.

La mayoría de las inmunoterapias antitumorales desarrolladas hasta hoy están diseñadas para incrementar la respuesta de los linfocitos T ante los antígenos del tumor. Sin embargo, muchas veces esta respuesta no es suficientemente fuerte como para causar el rechazo del tumor y muchas veces puede surgir tolerancia hacia diversos antígenos.

A pesar de que el sistema inmune es capaz de reconocer células neoplásicas como extrañas queda un gran reto a vencer:

¿CÓMO DARLE A CONOCER AL SISTEMA INMUNE QUE LAS CÉLULAS CANCEROSAS, A PESAR DE SER PROPIAS, NO SON DESEABLES?

Ante este gran reto, este trabajo tiene el propósito de presentar en forma detallada las características de un grupo de proteínas denominadas *Proteínas de Choque Térmico (Hsp)*, y su posible uso como señuelos para atraer a las células del sistema inmune hacia las neoplásicas, lo que podría ser utilizado en nuevas y prometedoras terapias antineoplásicas.

2. Objetivo

Presentar información acerca de las características, estructura y funciones de las proteínas de choque térmico; su participación en el cáncer, sus propiedades inmunogénicas y su uso en nuevas inmunoterapias antineoplásicas.

3. Metodología

La información utilizada en esta tesis fue recopilada de artículos de carácter experimental o de revisión a través de búsquedas realizadas en el servidor PUBMED del Instituto Nacional de Salud (NIH), EUA y en revistas científicas del acervo hemerográfico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asimismo, se utilizó el apoyo de diversos libros de texto en la definición de conceptos básicos.

4. Generalidades de las Proteínas de Choque Térmico (Hsp)

Las proteínas de choque térmico (Hsp) son un grupo de proteínas de estructura altamente conservada, cuya transcripción es activada en respuesta a diversos tipos de estrés celular* (Parsell y Lindquist, 1993; Beere, 2004).

El descubrimiento de las Hsp fue realizado por F. Rittosa en 1962, quien al llegar a su laboratorio una mañana descubrió que debido a un mal ajuste en el termostato de su incubadora, los cromosomas de las células salivares de sus moscas presentaban un patrón extraño. Mas tarde comprobó que este patrón extraño era debido a una inusual expresión génica, que hoy se relaciona con la síntesis de Hsp. Más adelante, en 1974, H. Mitchell y A. Tissières demostraron que el choque térmico induce la expresión de un nuevo repertorio de proteínas: las Hsp (denominadas así por su procedencia), aunque más tarde se demostró que también pueden ser inducidas en respuesta a diferentes tipos de estrés celular.

Las Hsp funcionan como chaperonas** que al unirse a proteínas desdobladas o desnaturalizadas previenen la formación descontrolada de agregados proteicos en la célula (Haley et al., 2000). Las Hsp se encuentran distribuidas en todos los reinos, excepto en bacterias patógenas

* El estrés celular puede ser definido como un cambio repentino en el ambiente celular para el cual la célula no posee una respuesta preparada (Parsell y Lindquist, 1993).

** Las chaperonas son proteínas cuya estructura les permite la interacción con diversos polipéptidos recién sintetizados en el interior de la célula, para ayudarlos a adquirir su estructura tridimensional o unirse a proteínas dañadas para facilitar su degradación por medio del proteasoma (Söti et al., 2003).

como *Mycoplasma ganitalium* y *Helicobacter pylori*. Diversos análisis filogenéticos han demostrado que los organismos unicelulares poseen uno o dos genes de Hsp, mientras que los multicelulares tienen cantidades considerablemente mayores. En el caso de los humanos existen diez genes diferentes que codifican para Hsp (Haslbeck et al., 2005).

En mamíferos, algunas Hsp son expresadas de manera constitutiva en determinadas estirpes celulares (Head et al., 1994; Derham y Harding, 1999) para ayudar a mantener el estado de homeostasis y facilitar el transporte, plegamiento y ensamblaje de polipéptidos (Concannon et al., 2003). Se ha observado que la transcripción de algunas Hsp se eleva durante diversos procesos celulares de protección contra el estrés oxidativo y envejecimiento, interferencia en la apoptosis* y desórdenes neurológicos (Hsu et al., 2003).

Los mecanismos básicos de cooperación entre algunas Hsp y chaperonas dependientes de ATP parecen estar conservados tanto en bacterias como en humanos (Haslbeck et al., 2005). Las Hsp, a diferencia de otras chaperonas, son capaces de unirse a varios sustratos a la vez (Haslbeck et al., 1999; Lee et al., 1997), de manera coordinada y con especificidad aún no descrita (Haslbeck et al., 2005).

4.1. Clasificación

Las proteínas de choque térmico están divididas en diversas familias de acuerdo a su tamaño, función y estructura. Westerheide y Morimoto citan

* La apoptosis es un conjunto de cambios metabólicos y morfológicos bien definidos que resultan en la muerte celular.

la existencia de seis familias: sHsp (proteínas de choque térmico pequeñas), Hsp40 (proteínas de dominio J), Hsp60, Hsp70, Hsp90 y Hsp 100 (Westerheide y Morimoto, 2005); cada una con diferente número de miembros (Tabla 1A).

A		B		
Familia	Miembros			
sHsp	Hsp20	HspB3	Mayores*	
	Hsp27	HspB8		
	HspB9	αA-Cristalina		
	cvHsp	αB-Cristalina		
	HspB2		Hsp110	
Hsp40	grp43		Hsp90	
	grp47		Hsp70	
	Hsp40		Hsp60	
Hsp60	grp56		Menores**	
	Hsp60			
Hsp70	Bip	Hsc70		grp34
	Hsp70	mtHsp70 (ó		grp47
	Hsp70t	grp75)		grp56
	Hsp70i	grp78		grp75
Hsp90	Hsp90		grp78	
	grp94		grp94	
	grp96		grp174	
Hsp100	Hsp100		De peso molecular de alrededor de 20kDa***	
	Hsp110			
	grp174		Todas las del grupo de las sHsp	

* Se presentan a 37°C y en ausencia de estrés.
 ** Pueden ser inducidas por escasez de glucosa.
 *** Son activadas promordialmente por estrés celular y choque térmico.

Tabla 1. Las Hsp son clasificadas de acuerdo a su tamaño, estructura y función. (A) La división de las Hsp en seis familias toma en cuenta su tamaño y estructura. Los miembros de la familia de sHsp han sido citados por: Arrigo y Welch, 1987; Boelens et al., 1998; Ingola y Craig, 1982; Iwaki et al., 1997, Kappe et al., 2001, Kato et al., 1994; Klemenz et al., 1991; Krief et al., 1999. (B) La clasificación en tres grupos toma en cuenta su función (Prohászka y Füst, 2004).

En la familia Hsp70 se han caracterizado al menos ocho miembros con una gran homología, diferenciados unos de otros por su localización intracelular y patrón de expresión (Tavaria et al., 1996); en el lumen del

retículo endoplásmico y la matriz mitocondrial se localizan la proteína de unión a la cadena pesada de los anticuerpos, Bip (Hsp70-5 ó Grp78) (Pelham, 1989) y mtHsp70 (Grp75, Hsp70-9 o mortalina) en el orden citado. El resto de los miembros de esta familia, residentes del citosol, son Hsp70, Hsc70 (Hsp70-8 ó Hsp73), Hsp70t (Hsp70-Hom ó Hsp701L), Hsp70-2 (HspA2) (Fourie et al. 2001), Hsp70i (iHsp70 ó Hsp72) y Gpr78.

Algunos autores dividen a las Hsp en tres grupos, dependiendo de la forma en la que son inducidas: mayores, menores y de bajo peso molecular (Prohászka y Füst, 2004). Dentro del grupo de las mayores se encuentran Hsp110, Hsp90, Hsp70 y Hsp60, las cuales se presentan a 37°C y en ausencia de estrés. Las menores son aquellas que pueden ser inducidas por carencia de glucosa e incluyen a las proteínas reguladas por glucosa (grp) de pesos moleculares 34, 47, 56, 75, 78, 94 y 174 kilodaltones (kDa). El tercer grupo, de bajo peso molecular, se compone de proteínas de alrededor de 20kDa (Prohászka y Füst, 2004), las cuales son activadas sobretodo por estrés celular y choque térmico.

4.2. Estructura y Función Molecular

A lo largo del tiempo se ha descrito a las Hsp como chaperonas, cuya función principal es prevenir el plegamiento erróneo de proteínas, aunque también son responsables de acelerar el plegamiento adecuado y la renaturalización de proteínas en estado no nativo (Concannon et al., 2003). En la actualidad, se les ha relacionado con funciones antiapoptóticas, debido quizás a su actividad de chaperonas, sin embargo, este no siempre es el caso (Beere, 2004; Parcellier et al., 2003). El papel regulador de las Hsp está intrínsecamente relacionado a su estructura y su

habilidad para interactuar con sustratos polipeptídicos (Georgopoulos y Welch, 1993).

La estructura de las familias Hsp60, Hsp70, Hsp90 y Hsp110 es bastante bien conservada. Las Hsp70 y Hsp90 se conforman de dos dominios. En el extremo del amino inicial poseen un dominio de ATPasa altamente conservado (Flaherty et al., 1990) y en el extremo del carboxilo terminal un sitio de unión a polipéptidos (Wang et al., 1993). En estas familias, la secuencia conformada por los aminoácidos EEVD presentes en el extremo carboxilo terminal es la responsable de mediar la comunicación entre ambos dominios de la proteína y, tiene la capacidad de interactuar con otro tipo de polipéptidos (Freeman et al., 1995). Más aún, se ha demostrado que la secuencia EEVD es esencial en la regulación de la protección contra el choque térmico (Li et al., 1992). El sitio de unión a ATP en el extremo amino de Hsp90, conocido como el doblez de Bergerat, es único entre las Hsp ya que sólo se encuentra en las girasas, topoisomerasas y cinasas de histidina bacterianas (Prodromou et al., 1997).

Algunos miembros de la familia de Hsp70 contienen una extensión de su secuencia en el extremo amino, la cual les permite unirse a la mitocondria o al retículo endoplásmico. El motivo KDEL presente en el extremo carboxilo de algunos miembros de esta misma familia es el que les permite su unión con el retículo endoplásmico.

La actividad de chaperonas de las Hsp que contienen un dominio de ATPasa, está regulada por medio de una reacción cíclica de unión e hidrólisis de ATP (Buchberger et al., 1995). Cuando las Hsp se encuentran

unidas a ATP, muestran una baja afinidad a otras proteínas, su unión y disociación es rápida; en cambio, cuando las Hsp están unidas a ADP la unión a proteínas se realiza en forma lenta pero con mayor estabilidad (Palleros et al., 1994; Palleros et al., 1991; Schmid et al., 1994). Esta reacción de interconversión entre la forma unida a ADP y la forma unida a ATP, es estabilizada por diversas co-chaperonas adicionales (Beere, 2004), como HDJ-1 y HDJ-2 para Hsp 40 (Freeman et al., 1995), Hip (proteína de interacción con Hsc70) para Hsc70 y Hop (proteína organizadora de Hsc70-Hsp90) para Hsc70 y Hsp90 (Frydman y Hohfeld, 1997). Estudios recientes demuestran que las Hsp presentes de manera constitutiva en el organismo se encuentran formando complejos multiproteínicos constituidos por Hsp y co-factores.

La familia de las sHsp se caracteriza por tener una estructura diferente al resto de las Hsp. En vez del dominio de ATPasa, las sHsp poseen un extremo amino flexible de 24 a 247 residuos (Van Montfort et al., 2001a; Van Montfort et al., 2001b; Haslbeck y Buchner, 2002), que posee la secuencia WDPF (Bova et al., 2000). En el carboxilo terminal, las sHsp poseen una región homóloga conocida como dominio α -cristalino, de 80 a 100 residuos de largo (De Jong et al., 1998). Ambos extremos de las sHsp son flexibles, lo que les confiere gran estabilidad.

El dominio α -cristalino está conformado por una estructura supersecundaria característica, compuesta de varias láminas β antiparalelas colocadas de forma que asemeja un sándwich (Kim et al., 1998; Van Montfort et al., 2001a). Los dominios α -cristalinos son importantes ya que son capaces de mediar la formación de oligómeros (Kim et al., 1998). La estructura cuaternaria del dominio α -cristalino es

variable (Haley et al., 1998) y permite formar complejos de sHsp de hasta 50 subunidades (Haslbeck et al., 2005).

Se ha observado que los dominios hidrofóbicos presentes en el carboxilo terminal y la secuencia WDPF del extremo amino de las sHsp, son críticos para la oligomerización (Bova et al., 2000; Narberhaus, 2002; Kim et al., 1998; Van Montfort et al., 2001a). Se ha demostrado que las sHsp forman oligómeros de diferentes longitudes. Las estructuras cuaternarias predominantes en los oligómeros de sHsp se conforman de 12 subunidades y son de dos tipos: tetraédrico (esférico) hueco (Haslbeck et al., 2005) y de barril (Von Montfort et al., 2001a). Los complejos de sHsp son estructuras dinámicas que intercambian subunidades constantemente (Sobott et al., 2002). El comportamiento dinámico de las sHsp permite a los sitios de unión al sustrato, contenidos en el interior del complejo, a quedar expuestos en la superficie (Giese y Vierling, 2002) y de esta manera, ser capaces de interactuar con un número diverso de proteínas.

La actividad de chaperona de las sHsp, en contraste con la mayoría de las Hsp, ocurre de manera independiente al ATP (Jacob et al., 1993; Garrido et al., 1999). El extremo carboxilo es el responsable de la actividad de chaperona molecular en esta familia. Experimentos hechos en levaduras con sistemas de doble híbrido demostraron que las sHsp pueden interactuar con un número limitado de moléculas. La Hsp27 interacciona con otras sHsp: α B-cristalina, Hsp20 y Hsp22 (Benndorf et al., 2001) y con las proteínas Ubc9 (Joanisse et al., 1998), PASS1 (Liu et al., 2000) y Daxx (Charette et al., 2000). La α B-Cristalina interacciona con la subunidad C8/ α 7 del proteasoma 20s (Boelens et al., 2001), mientras que HspB2 se une y activa a MDPK (Suzuki et al., 1998) y cvHsp interactúa

con α -filamina (proteína que participa en el entrecruzamiento de las fibras de actina que unen proteínas de membrana con el citoesqueleto) (Krief et al., 1999).

Otra característica importante de las sHsp es que presentan residuos de serina susceptibles a ser fosforilados. Por ejemplo, la fosforilación de Hsp27 se inicia con la activación de la cascada de MAPK p38, quien a su vez fosforila a las cinasas MAPKAP-2 y MAPKAP-3, responsables directas de la fosforilación de las sHsp (Landry y Hout, 1995; Guay et al., 1997).

4.3. Expresión de Hsp e Inducción de la Respuesta al Choque Térmico (HSR)

Las Hsp se encuentran en casi todos los compartimentos de la célula incluyendo citoplasma (Welsh y Gaestel, 1998), mitocondria, núcleo, nucleolo, retículo endoplásmico y membrana. Sin embargo, la expresión de las Hsp en células de diferentes tejidos es variable. Por ejemplo, las proteínas de la familia sHsp se encuentran distribuidas en todo el organismo: Hsp27, α B-cristalina, Hsp20, cvHsp y HspB9 se encuentran expresadas en forma abundante en músculo esquelético y corazón; además, las tres primeras también están presentes en riñones, vejiga, pulmones, estómago y piel (De Jong et al., 1998; Krief et al., 1999; Benndorf et al, 2001; Kappe et al., 2001).

Por otra parte, la proteína α -cristalina (Klemenz et al., 1991), se encuentra en el organismo en dos isoformas: la α A-cristalina y la α B-cristalina, de secuencia 57 por ciento similar (Ingola y Craig, 1982). A pesar de la similitud en secuencia, estas dos proteínas poseen funciones muy

diferentes, mientras que la α B-cristalina está expresada en numerosos tejidos en el cuerpo, la α A-cristalina es el mayor componente del cristalino en vertebrados (Horwitz, 1992).

La expresión de las Hsp en los diferentes tejidos es alterada durante el estrés celular como consecuencia de las diferentes demandas celulares. La respuesta al choque térmico (HSR) es genética a diversos tipos de estrés ambiental o fisiológico, que resultan en la inducción intermediaria de genes que codifican a chaperonas moleculares, proteasas y otras proteínas esenciales para la protección y recuperación al daño celular originado por la aparición de proteínas alteradas o desnaturalizadas (Westerheide y Morimoto, 2005). Muchas Hsp, debido a su función de chaperonas moleculares, son críticas como guías de los estados conformacionales en la síntesis, plegamiento, translocación, ensamblaje y degradación de proteínas (Hartl, 1996). La célula requiere más de una Hsp para responder al estrés, es por ello que las Hsp funcionan de manera coordinada. Un ejemplo es la acción de Hsp25 y Hsp70. La proteína Hsp25 puede funcionar como amortiguador para el desdoblamiento de intermediarios de proteínas en células después de un choque térmico, hasta que la Hsp70 sea activada y adquiera actividad de chaperona, para renaturalizar las proteínas dañadas (Ehrnsperger et al., 1997). Por lo tanto, la regulación adecuada de la expresión y activación de Hsp es crítica para el bienestar de la célula.

Diferentes estímulos inducen la expresión de Hsp: estrés oxidativo, metales pesados, análogos de amino ácidos, estrés osmótico, venenos metabólicos, choque por calor, agentes quimioterapéuticos, escasez de nutrientes, radiación ultra violeta y TNF (Lindquist y Craig, 1988). En

estos casos, la sobreexpresión de Hsp es el mecanismo fundamental de protección, ya que hace a las células más resistentes a agresiones citotóxicas y les confiere termotolerancia (Parsell y Lindquist, 1993). La activación de las Hsp durante condiciones de estrés celular va acompañada de una represión en la síntesis general de proteínas y mRNA. Esto se comprobó a través de estudios en los que se observó que la Hsp27 puede inhibir directamente la síntesis de proteínas *in vitro*, ligándose a los factores de unión a CAP e IF4G, esenciales para la traducción de la mayoría de los mRNA (Cuesta et al., 2000). La inhibición de la síntesis de proteínas, ocasionada tras la sobreexpresión de Hsp, es de gran relevancia ya que puede constituir un mecanismo por medio del cual se reduce el riesgo de aumentar el número de proteínas en el interior de la célula que puedan desnaturalizarse durante el estrés celular.

Durante muchos años, los modelos que involucran la regulación de las Hsp por medio de su interacción con otras chaperonas, han estado en conflicto con modelos que afirman que el factor de choque térmico (Hsf), proteína clave en la regulación de Hsp, es el responsable directo de valorar el grado de estrés al que está expuesta la célula (Voellmy, 2004). Existe evidencia de que anticuerpos específicos anti-Hsf inhiben la activación de las Hsp; lo que confirma que Hsf es el factor clave en la regulación de la expresión de genes durante el estrés celular (Baler et al., 1993; Ali et al., 1998). Otra evidencia son los estudios realizados en fibroblastos privados de genes de Hsf (*hsf^{el-}*), en los que se observa una deficiencia en la inducción de la expresión de genes de Hsp (McMillan et al., 1998; Zhang et al., 2002); efecto que puede ser revertido por medio de la transfección con *hsf* y su expresión (Holmberg et al., 2001).

4.3.1. Hsf como Sensor del Estrés Celular

Desde los años 80, se observó que el común denominador capaz de inducir la expresión de la Hsp, es el desdoblamiento de proteínas en células bajo estrés fisiológico, y por lo tanto, se ha concluido que esta señal es la responsable de activar a Hsf (Hightower, 1980; Haslbeck et al., 2005). Un experimento realizado en 1986 por Anathan et al., prueba que la presencia de proteínas desnaturalizadas en el interior de la célula es el detonante de la respuesta contra el estrés. En este experimento, se co-inyectó un gen reportero bajo el promotor de Hsp70 y proteínas desnaturalizadas o nativas en ovocitos de *Xenopus*; el resultado, arrojó que sólo las células inyectadas con proteínas desnaturalizadas eran capaces de expresar el gen reportero (Anathan et al., 1986). Es por ello que Anathan et al., concluyeron que las proteínas desnaturalizadas son las únicas capaces de desencadenar la activación de Hsf y Hsp, y no así las nativas.

Existen diferentes genes que codifican para Hsf; mientras que *Drosophila melanogaster* posee un sólo gen de Hsf, los vertebrados pueden expresar hasta cuatro genes diferentes: Hsf1, Hsf2 y Hsf4 han sido encontrados en mamíferos, y todos ellos más Hsf3 específicamente en aves (Nakai y Morimoto, 1993). La estructura de Hsf se compone de un dominio de unión a DNA en el extremo amino que contiene un motivo de hélice, vuelta, hélice (Clos et al., 1990). Este dominio es capaz de interactuar con el elemento de choque térmico (HSE), un dominio muy bien conservado de DNA que precede al promotor de los genes de las proteínas de choque térmico (*hsp*). Además, todas los Hsf poseen una secuencia repetida e hidrofóbica adyacente al dominio de unión a DNA, seguido de un dominio

de transactivación cercano al extremo carboxilo de la proteína (Green et al., 1995; Wisniewski et al., 1996).

En una situación de estrés, Hsf3 adquiere la actividad de unión al HSE presente en el DNA (Tanabe et al., 1997). Células carentes de Hsf3 poseen una inducción de Hsp defectuosa y una baja termotolerancia. El Hsf1 en aves es capaz de transactivar marginalmente a los genes mayores de Hsp, pero brinda a la célula tolerancia contra estrés severo y moderado (Inouye et al., 2003). Por lo tanto, Hsf1 y Hsf3 poseen un efecto de resistencia al estrés. Por su parte, Hsf4 se puede encontrar en dos formas alternativas: Hsf4a y Hsf4b las cuales desempeñan funciones opuestas en la célula. Cuando el Hsf4a es expresado en grandes cantidades actúa tanto como inhibidor de la síntesis constitutiva de Hsp como de la inducida por medio de estrés celular (Nakai et al., 1993), mientras que Hsf4b es activador de la transcripción de Hsp (Tanabe et al., 1999).

4.3.2. Transcripción de Hsp Mediada por Hsf

La activación del Hsf requiere de dos eventos consecutivos: la homotrimerización del Hsf y la adquisición de la actividad de unión al HSE (Baler et al., 1993). Experimentos de mutagénesis han demostrado que la trimerización y la actividad de unión a HSE son eventos inseparables (Zuo et al., 1994). De hecho, se ha observado que la alta afinidad de Hsf a secuencias de HSE depende aparentemente de la correcta yuxtaposición de múltiples Hsf (Figura 1). Esta oligomerización puede ser suprimida por medio de interacciones entre regiones hidrofóbicas y una o más proteínas represoras, así como mutaciones en el dominio de unión a DNA (Liu y Thiele, 1999). La activación del Hsf es

controlada por un mecanismo de represión (Green et al., 1995) que actúa sobre un dominio regulatorio de 201-330 residuos (Zuo et al., 1995). Esta represión se basa en un modelo competitivo en el cual la unión de Hsp al sitio represor de Hsf provoca una regulación negativa. Niveles elevados de proteínas desdobladas acaparan a Hsp en condiciones de estrés, de esta manera, las Hsp son capaces de desligarse de Hsf, liberándolo y permitiendo su trimerización (Figura 1). Cuando ocurre una mutación puntual en esta estructura, Hsf adquiere una elevada actividad de transcripción aún en ausencia de estrés (Knauf et al., 1996).

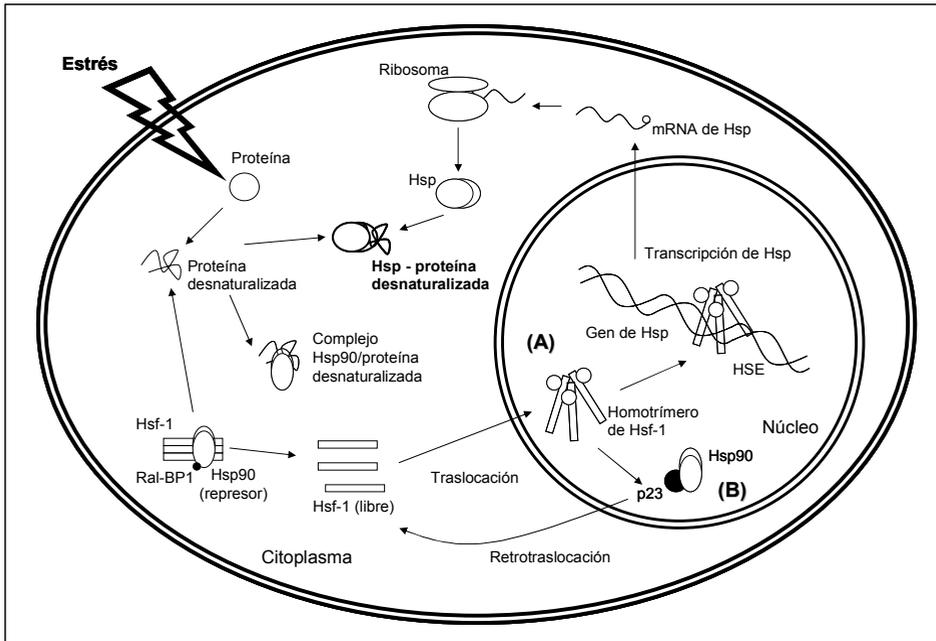


Figura 1. Activación de Hsf-1 en respuesta al estrés celular. Hsp90 (represor de Hsf-1) compete por las proteínas desnaturalizadas, liberando a Hsf-1. (A) Hsf-1 trimerizado y fosforilado es capaz de unirse a HSE en los genes de Hsp e iniciar su transcripción. (B) El complejo formado por Hsp90 y p23 es capaz de reprimir la trimerización de Hsf-1.

Diversos estudios han demostrado que Hsp90 y sus co-chaperonas, como la proteína de unión a Ral-1 (Ral-BP1), interactúan en forma directa con Hsf1 (Nadeau et al., 1993). Los inhibidores de Hsp 90, de la familia de las benzoquinonas (como herbimicina y geldamicina), activan a Hsf1 (Hedge et al., 1995; Knowlton y Sun, 2001). Los experimentos con anti-Hsp90 han confirmado el incremento de la actividad de unión de Hsf1 a HSE (Ali et al., 1998). Se cree que la regulación negativa de Hsf es causada de manera primordial por el complejo multimérico formado por Hsp90 y p23 (Figura1B) (Pratt y Toft, 1997). Este mecanismo ha sido previamente descrito durante el periodo de latencia de los receptores a hormonas esteroides (Pratt y Toft, 1997). Varios experimentos han comprobado que el tratamiento con calor hace desaparecer el complejo Hsp90-Hsf1 presente en las células. La disminución en los niveles de dicho complejo es proporcional al aumento de Hsf trimerizado (Guo et al., 2001). Por otra parte, existe evidencia que la sobreexpresión de Hsp90 durante un evento de choque térmico, deprime de forma sustancial la inducción de Hsf1 (Zhao et al., 2002); y que la supresión de p23 en ausencia de estrés, es capaz de activar a Hsf (Bharadwaj et al., 1999).

La molécula atenuante de la actividad ATPasa de Hsp70 (CHIP) ha sido identificada como clave en la regulación de la actividad de Hsf, ya que es la encargada de mantener la tasa de formación/disociación de los complejos triméricos de Hsf1 (Dai et al., 2003). Si la tasa de formación de homotrimeros de Hsf fuera demasiado rápida, habría una reducción en la sensibilidad de la célula al estrés, por el contrario, si la formación de homotrimeros fuera lenta, los complejos de Hsf1 resultantes estarían constitutivamente activos. Esta regulación se debe a que el CHIP es el

encargado de la remoción de p23 de los complejos de Hsp90-p23 antes mencionados (Connell et al., 2001). Una vez terminada la respuesta al estrés, el trímero de Hsf es reprimido por medio de su unión al complejo Hsp90-p23-Fkbp52 (Bharadwaj et al., 1999; Guo et al., 2001), inhibiendo la unión de Hsf al DNA (Ballinger et al., 1999). Existe evidencia que sugiere:

- Que la fosforilación de Hsf en los residuos de serina 303, 307 y 363, acelera su inactivación tras la conclusión de un evento de estrés (Holmberg et al., 2002).
- Que el Hsf es capaz de ser activado directamente por estrés celular (Zhong et al., 1998) ya que los oxidantes, tales como el peróxido de hidrógeno, provocan la activación de Hsf1 a través de la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína localizados en su sitio activo (Ahn y Thiele, 2003).
- Que el complejo multimérico Hsp90-p23 se disocia del sitio represor de Hsf y se une a diversos productos de la oxidación extensiva de moléculas en la célula, así como a los grupos tioles de las proteínas afectadas (Liu et al., 1999).

4.4. Papel de las Hsp en la Respuesta ante el Estrés Celular

En situaciones de estrés celular los niveles intracelulares de muchas Hsp aumentan de manera rápida y proporcional al incremento en el número de proteínas desnaturalizadas acumuladas (Concannon et al., 2003). En muchos casos la activación de las Hsp brinda un efecto citoprotector, ya

que las Hsp tienen la capacidad de unirse a las proteínas desnaturalizadas para mediar su regreso a un estado nativo o bien a su degradación; lo cual, en ambos casos, trae como consecuencia la recuperación de la célula (Concannon et al., 2003). Los mecanismos por los cuales las Hsp regulan diferentes procesos de respuesta al estrés, la modulación del citoesqueleto de actina y filamentos intermedios, el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, la tumorigénesis y la señalización, se describen en los subíndices siguientes para comprender con mayor claridad estos mecanismos.

4.4.1. Función de las Hsp como Chaperonas

La acumulación de proteínas desnaturalizadas en el interior de la célula puede causar daños a los diversos componentes y desencadenar la apoptosis. El papel de la actividad de chaperona de las Hsp es básicamente de unión a proteínas alteradas o desnaturalizadas acumuladas y evitar que causen daño o conlleven a la muerte celular, confiriendo citoprotección. La habilidad de la Hsp27 de reparar proteínas desnaturalizadas puede incrementar la tasa de supervivencia de la célula, limitando el número de proteínas en mal estado que pueden desencadenar la apoptosis (Concannon et al., 2003).

Dos proteínas pertenecientes a la familia de las sHsp, la α -cristalina bovina y Hsp25, fueron las primeras reportadas con actividad de chaperonas (Horwitz, 1992). En el caso de las sHsp, la actividad de chaperona puede estar regulada por dos mecanismos.

- La presencia de proteínas en un estado no nativo en la célula; esto favorece el establecimiento de una conformación de alta afinidad (Haslbeck et al., 2005).
- Modificaciones post-traduccionales de las sHsp.

En particular, la fosforilación observada en sHsp de mamíferos puede ser un mecanismo importante para cambiar los perfiles de actividad de las sHsp de acuerdo a las demandas celulares (Koteiche y Mchaourab, 2003). En células normales, la Hsp27 forma oligómeros que varían en tamaño dependiendo del grado de fosforilación de los monómeros. Durante el estrés, el nivel de fosforilación de los monómeros de Hsp27 se incrementa. En específico, las fosforilaciones en los residuos 15, 78 y 82 de serina, resultan en la reorganización de los oligómeros a pequeñas unidades tetraméricas. Esta fosforilación es catalizada por las cinasas MAPKAP2 y MAPKAP3, que a su vez son activadas por medio de fosforilaciones dependientes de la MAPK p38. La proteína Hsp27 puede ser fosforilada por la isoforma delta de la proteína cinasa C.

Como la función de las sHsp es de unión a proteínas desnaturalizadas, la plasticidad de su estructura cuaternaria es funcionalmente importante para reconocer y unirse a una población diversa de proteínas blanco, de conformación variable (Haley et al., 2000). Todos los sitios de unión a proteínas de las sHsp son de carácter hidrofóbico, lo que además de proporcionarles la función de chaperonas, influye en su capacidad de oligomerización (Giese y Vierling 2002).

4.4.2. Regulación del Citoesqueleto

Los microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos son los principales componentes del citoesqueleto. Los microfilamentos de actina son los encargados de mantener la forma de las células y juegan un papel importante en muchos procesos esenciales de la célula como: motilidad, endocitosis, exocitosis, citocinesis, anclaje a otras células o sustratos y transducción de señales. Los filamentos intermedios y los microtúbulos se expanden a lo largo del citosol formando redes cuyo origen es el núcleo. Los filamentos intermedios funcionan estrictamente como soporte de las células, ayudándolas a conformar tejidos, en tanto que, los microtúbulos se encargan de la motilidad de las células a través de los cilios y flagelos; y, proporcionan un sistema de transporte a vesículas y permiten la migración de los cromosomas durante la mitosis (Lodish et al., 2000).

Cuando una célula entra en estrés, existe una reorganización rápida del citoesqueleto acompañada de un incremento en la síntesis de diversas Hsp. En esta situación los microtúbulos se desensamblan, los filamentos intermedios se colapsan hacia la región perinuclear y los microfilamentos de actina se desorganizan. Las proteínas Hsp70 y Hsp90 se unen primordialmente a la mayoría de las redes de microtúbulos y al centrosoma, mientras que las sHsp parecen desempeñar un papel importante en la manutención de la integridad de los microfilamentos y los filamentos intermedios (Liang y MacRae, 1997).

Las sHsp participan en la protección de los microfilamentos de actina neutralizando las proteínas que los dañan y que son inducidas por el estrés celular. La actividad de protección del citoesqueleto se diferencia de su

función como chaperona debido a la acción, que en este caso, la ejercen los diferentes monómeros de sHsp, mientras que la función de chaperonas requiere de una conformación multimérica.

La proteína Hsp25, homóloga de Hsp27 en ratones, nombrada originalmente como proteína inhibidora de la polimerización de actina (IAP), es capaz de inhibir el acoplamiento de los filamentos previniendo la adición de monómeros.

La Hsp27 no ejerce ningún efecto sobre la polimerización de actina *in vitro* (Schneider et al., 1998) y sólo previene la disrupción del citoesqueleto de actina, tras un evento de estrés (Concannon et al., 2003), en cambio, *in vivo* la sobre-expresión de ésta incrementa la polimerización de los microfilamentos de F-actina en la corteza, lo que resulta en una deformación de la membrana, pinocitosis, migración celular y acumulación de fibras de estrés (Landry y Hout, 1995). El incremento en la polimerización es capaz de prevenir la degradación de los microfilamentos en situaciones de hipertermia (Lavoie et al., 1993) o durante la exposición a oxidantes (Hout et al., 1995).

La protección mediada por Hsp27 también se observa cuando al medio de cultivo se agregan mitógenos, citocalasina D, carcinógenos o antineoplásicos (Arrigo, 2000). También se ha demostrado que la tasa de supervivencia de las células que sobre-expresan Hsp27 se ve incrementada como resultado de la estabilización de los microfilamentos de actina y su rápida recuperación (Hout et al., 1996). Por el contrario, se ha observado que una disminución en los niveles de Hsp27 provoca

desorganización del citoesqueleto e inhibición del crecimiento (Mairesse et al, 1996; Horman et al., 1999).

La activación de la cascada de MAPK p38, la cual es la responsable de la fosforilación de las sHsp, es un evento subsecuente a la activación de las GTPasas Rac y Cdc42, lo cual indica una posible conexión entre la fosforilación de las sHsp y los rearrreglos en el citoesqueleto (Guay et al., 1997). De hecho, la introducción de moléculas de Hsp27 no fosforilables (mutadas), no produce ningún efecto protector (Hout et al., 1996). Por otra parte, se ha demostrado que Hsp27 de pavo y ratón inhiben la polimerización de actina (Benndorf et al., 1994) dependiendo del grado de fosforilación y organización estructural de la sHsp. Todo esto indica que sólo el monómero no fosforilado de Hsp27 es capaz de inhibir la polimerización de actina, mientras que los fosforilables son los responsables de regular la dinámica del citoesqueleto y su protección (Benndorf et al., 1994).

A pesar de que se ha comprobado que existe una interacción entre las sHsp y actina, no se ha encontrado ninguna similitud en la secuencia o estructura que sugieran cual es el sitio de unión entre ambas proteínas. Con excepción de la β -lámina que se encuentra en los sitios de polimerización de actina (Rahman et al, 1995) y en el extremo amino del dominio α -cristalino de las sHsp (De Jong et al., 1998; Kim et al., 1998). Se ha especulado que este sitio es de importancia para la interacción entre la F-actina y Hsp20 o Hsp27, aunque diversos ensayos de inmunoprecipitación no han podido dilucidar si dicha interacción es directa (Brophy et al., 1999). También se ha observado que Hsp 27 y α B-cristalina interactúan con varios filamentos intermedios (Perng et al.,

1999) y con microtúbulos (Hino et al., 2000) pudiendo promover la sobrevivencia de la célula por medio de la intervención de toda una red dinámica.

4.4.3. Reacción ante el Estrés Oxidativo

Las Hsp también protegen a la célula de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por ejemplo, Hsp27 protege ante las ROS generadas tras la estimulación con TNF α y ante el estrés oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno o menandiona (Mehlen et al., 1995), incrementando los niveles celulares de glutatión y modulando el potencial redox de la célula, (Mehlen et al., 1996). Esto fue comprobado a través de experimentos en los cuales se incrementó la concentración de Hsp27 en tratamientos que reducen el nivel de glutatión en la célula (Ito et al., 1998).

4.4.4. Regulación de la Apoptosis

La evidencia de que las Hsp son capaces de inhibir el proceso de apoptosis se encontró a través de un experimento en el que se observó que la supresión de la función de Hsp90, ocasionada por el fármaco geldamicina en células tumorales, lleva al arresto del ciclo celular y la muerte (Whitesell et al., 1994). Más tarde, otros estudios revelaron que las Hsp pueden:

- Ayudar a la supervivencia de la célula y evitar la maduración proteolítica y la activación de caspasas (Beere et al., 2000; Garrido et al., 1999; Mosser et al., 2000), con lo cual se inhibe la degradación de

sustratos importantes para la supervivencia de la célula, incluyendo la cinasa de adhesión focal (FAK) (Mao et al., 2003) y PARP (Garrido et al., 1999; Mosser et al., 2000).

- Modular las cascadas de señalización intrínseca y extrínseca de la apoptosis a través de una regulación negativa en uno o más puntos de dichas cascadas.
- Inhibir la salida de factores pro-apoptóticos de la mitocondria (Mosser et al., 2000) así como reprimir la actividad de las diferentes caspasas.
- Prevenir la muerte celular provocada por eventos independientes de caspasas (Jaattela et al., 1998).

Las Hsp90, Hsp70 y Hsp27 inhiben la formación del complejo del apoptosoma, regulando en forma negativa la actividad de las caspasas 9 y 3 (Figura 2). Hsp 27 interactúa directamente con el citocromo C (Bruey et al., 2000), el cual previene la oligomerización del componente del apoptosoma Apaf-1 y regula de manera negativa la activación de la pro-caspasa 9. Hsp 70 y Hsp 90 se asocian de manera directa a Apaf-1, previniendo el reclutamiento y la activación de la pro-caspasa 9, (Beere et al., 2000; Saleh et al., 2000). En el caso de Hsp70, su unión con Apaf-1 puede resultar en la inhibición de la oligomerización de Apaf-1 (Saleh et al., 2000) o en el mantenimiento del oligómero de la misma en una conformación incompatible con la pro-caspasa 9, que previene el acceso de la pro-caspasa al dominio CARD de Apaf-1 (Beere et al., 2000).

Se ha comprobado que Hsp 27 es capaz de inhibir la cascada de apoptosis iniciada por la unión de ligandos al receptor Fas (Mehlen et al., 1996). Este efecto lo logra por medio de su interacción con dos diferentes

proteínas: pro-caspasa 3 y Daxx (Figura 2). La interacción de Hsp27 con la pro-caspasa 3 previene su activación (esta función la presentan también Hsp70 y α -B cristalina) (Pandey et al., 2000) (Figura 2). La unión de Hsp 27 con Daxx inhibe su interacción tanto con el receptor de Fas como con Ask 1 (Charette et al., 2000).

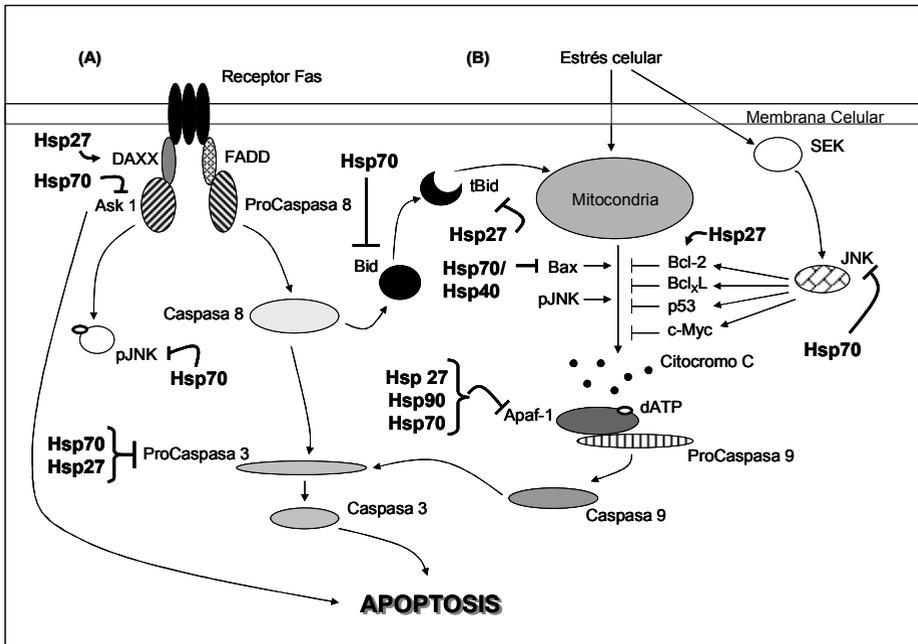


Figura 2. Inhibición de diferentes componentes de las cascadas extrínseca (A) e intrínseca (B) de la apoptosis por medio de diversas Hsp.

La interacción entre Hsp y sus co-chaperonas puede incrementar su actividad antiapoptótica. Por ejemplo, la cooperación entre Hsp70 y sus co-chaperonas Hdj-1 (Hsp40) o Hdj-2 (HSDJ) previene la translocación de Bax a la mitocondria y evita la apoptosis provocada por óxido nítrico (Gotoh et al., 2004) (Figura 2). Esta función depende de la actividad de

chaperona de Hsp 70 y de la prenilación en el carboxilo terminal (motivo CaaX) de Hdj-1 y Hdj-2 (Gotoh et al., 2004).

Dos estudios recientes han demostrado que Hsp70 y Hsp27 modulan la apoptosis dependiente de Bid (Gabai et al., 2002; Paul et al., 2002) (Figura 2), quien es cortada por medio de la caspasa 8 para generar Bid truncada (tBid), la cual favorece la salida de factores pro-apoptóticos de la mitocondria de manera dependiente a Bax (Luo et al., 1998). En consecuencia, este evento integra las cascadas intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis.

Además, Hsp27 es capaz de inhibir a Smac (Chauhan et al., 2003), evitando la apoptosis en células de mielina tratadas con dexametasona. De manera similar, Hsp70 puede suprimir la apoptosis provocada por TNF e inactivar a Bid y, por lo tanto, interfiere en la cascada de señalización de JNK y modula la salida del citocromo C (Tournier et al., 2000) y Smac (Chauhan et al., 2003) de la mitocondria.

Hsp70 suprime la activación de JNK (Mosser et al., 2000) mediante la defosforilación de JNK fosforilado (pJNK) (Meriin et al., 1999). En forma alternativa, Hsp70 inhibe la fosforilación de JNK por medio de su interacción con SEK (Park et al., 2001). JNK es un componente requerido para la apoptosis provocada por Fas que participa en varias vías apoptóticas. Esta cinasa, estimula la salida del citocromo C de la mitocondria por medio de la fosforilación de c-Myc, p53 (Fuchs et al., 1998), Bcl-2 y Bcl-xL (Yamamoto et al., 1999), inhibiendo su efecto antiapoptótico (Figura 2). Por lo tanto, el ataque de Hsp70 a JNK es el mecanismo principal de la supresión de la liberación del citocromo C

(Beere and Green, 2001; Mosser et al., 2000). Se ha demostrado también que JNK está implicado en la salida de los factores apoptóticos Smac/Diablo de la mitocondria (Chauhan et al., 2003).

Las Hsp ayudan a evitar la apoptosis provocada por TNF que normalmente desencadena el proceso de apoptosis por medio del reclutamiento de FADD y la activación de la cascada de la pro-caspasa 8. Sin embargo, se ha observado que la sobreexpresión de Hsp90 y Hsp27 logra la inducción de la expresión de genes antiapoptóticos como TRAF1, TRAF2, c-IAP1, c-IAP2 (Wang et al., 1998) y del homólogo de Bcl-2, A11 (Wang et al., 1999) (Figura 3). Hsp 90 es capaz de unirse a RIP, componente esencial en la activación de la cinasa del inhibidor I κ B (IKK), para mantener su estabilidad y permitir la activación de NF- κ B (Chen et al., 2002) promoviendo la proliferación de la célula. Se ha observado también una interacción la isoforma β de IKK y Hsp90 (Park et al., 2003).

Percellier et al. demostraron que Hsp27 puede mediar la activación de NF- κ B y llevar a la supervivencia de la célula por medio de la promoción de la degradación de I κ B poliubiquitinado en el proteasoma (Parcellier et al., 2003). Esto se basa en que la actividad de la chaperona Hsp27, hace que I κ B fosforilado interactúe con el proteasoma 26s (Percellier et al., 2003) (Figura 3).

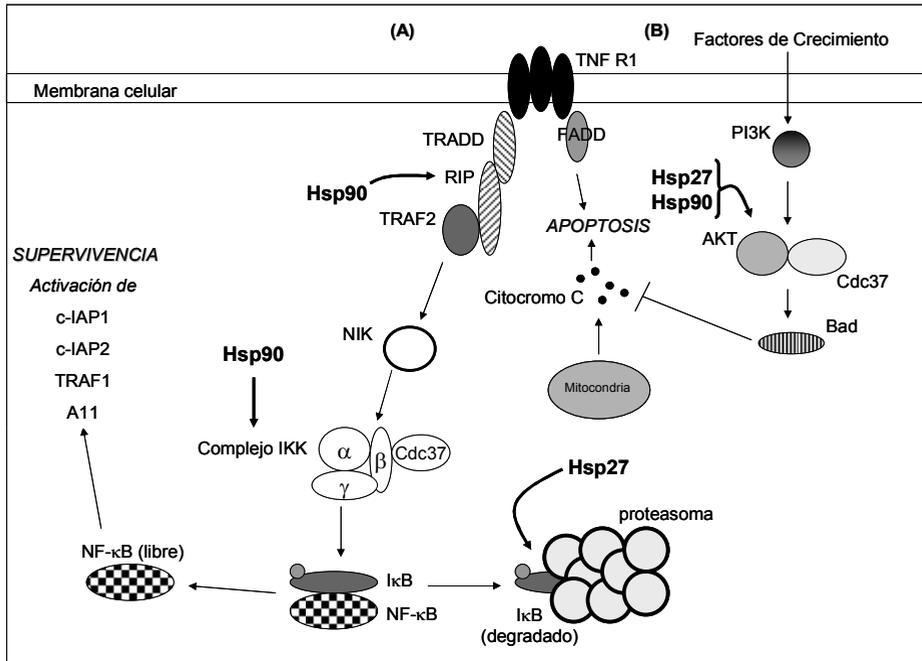


Figura 3. Algunas Hsp promueven la supervivencia de la célula. (A) Cascada de señalización activada por TNF que resulta en la activación de NF-κB y la degradación de su represor IκB. (B) Hsp90 y Hsp27 se unen al complejo AKT/Cdc37 aumentando la actividad inhibitoria de Bad sobre la vía intrínseca de la apoptosis.

Por otra parte, Hsp27 y Hsp90 ayudan a la supervivencia de la célula por medio su interacción directa con la proteína cinasa B (AKT) (Sato et al., 2000). Al unirse a AKT, ambas Hsp son capaces de potenciar el efecto inductor del complejo AKT/Cdc37 sobre Bad (Sato et al., 2000) (Figura 3). A su vez, el incremento en la actividad de Bad suprime la salida de citocromo C de la mitocondria. Esto se comprueba ya que al agregar geldanamicina (inhibidor de Hsp90) las células se sensibilizan a los efectos pro-apoptóticos del taxol y del inhibidor UCN-01 de la proteína cinasa C (PKC) (Solit et al., 2003).

4.5. Relevancia Clínica de las Hsp

Las Hsp se encuentran sobre-expresadas en enfermedades neurodegenerativas y cáncer, padecimientos que se caracterizan por una alta acumulación intracelular de proteínas dañadas, generadas por medio de mutaciones y procesos de inflamación, isquemia y/o heridas.

Se ha observado que niveles altos de Hsp70 contribuyen a la disociación de agregados de proteínas en los padecimientos neurodegenerativos de Parkinson, Alzheimer, ataxia espinocerebelar, esclerosis lateral amiotrófica y las enfermedades de Huntington y Kennedy (Kakizuka, 1998); disminuyendo la degeneración de las células del tejido nervioso (Warrick et al., 1999).

En el caso del cáncer, se ha observado que la principal función de las Hsp es la de interactuar y regular la actividad de muchos factores de transcripción, moléculas señalizadoras y cinasas. Las células tumorales expresan niveles altos de Hsp, lo que sugiere que una cantidad elevada de chaperonas moleculares se puede asociar al estado neoplásico.

5. Papel de las Hsp en el Cáncer

Diversos estudios han demostrado que las funciones que desempeñan las Hsp contra el estrés celular son paradójicamente las que se asocian a la progresión del cáncer. De hecho, algunas teorías señalan que las Hsp y Hsf son en sentido estricto necesarias para la supervivencia de la célula durante la progresión del tumor y la metástasis (Volloch y Sherman, 1999; Jones et al., 2004). Dado a que las Hsp tienen la capacidad común de modificar estructuras e interactuar con otras proteínas (Netzer y Hartl, 1998; Freeman y Yamamoto, 2002), pueden participar en los procesos de proliferación, diferenciación, invasión, metástasis, muerte y activación del sistema inmune.

5.1. Correlación entre los niveles de Hsp y Diferentes Tipos de Cáncer

Las Hsp son sobre-expresadas en una gran variedad células y tejidos neoplásicos. Es por ello que las Hsp no son útiles en el diagnóstico inmunopatológico basado en la presencia anticuerpos, con excepción de la α B-cristalina, que es útil para la identificación de carcinoma renal (Pinder et al., 1994), y la Hsp27 o Hsp90, que ayudan a la identificación de células de linfoma conocidas como Reed-Sternberg (Hsu y Hsu, 1998).

En algunos tejidos, la sobre-expresión de niveles de Hsp puede indicar la presencia de células anómalas y principios de carcinogénesis. Por ejemplo, Hsp100 y Hsp60 se relacionan con el proceso neoplásico en el cervix uterino y en colon. Hsp70 se asocia con la carcinogénesis del epitelio oral e incluso puede ser utilizado como un marcador de carcinoma

hepatocelular temprano. Hsp27 está sobreexpresada en el endometrio hiperplásico y sirve como marcador de metaplasia escamosa en el cervix uterino. Además, Hsp27 disminuye durante carcinomas esofágicos al momento en el que se convierten en adenocarcinomas; pero incrementa cuando el proceso concluye en carcinoma de células escamosas. En este último caso, Hsp27 se puede emplear como biomarcador cánceres de cierto tipo histológico.

La expresión de Hsp también puede correlacionar con el grado de diferenciación de ciertos tejidos o con la malignidad del cáncer. Por ejemplo, la sobreexpresión de Hsp27 y Hsp90 es común en carcinomas endometriales del cervix uterino y del epitelio oral altamente diferenciados. La sobreexpresión de Hsp70, grp28 o Hsp27, con una baja diferenciación del tejido, se encuentran frecuentemente en astrocitomas, cáncer de ovario, mama y epitelio oral (Hsp27), y carcinoma de pulmón (grp28).

La Hsp70 se asocia a la proliferación celular incrementada en mama, cervix uterino y pulmones (Ciocca y Calderwood, 2005), y se ha observado que se encuentra presente en metástasis en nodos linfáticos de dichas enfermedades. La sobreexpresión de Hsp70 en biopsias de cáncer de pulmón muestra un valor predictivo débil (Volm y Rittgen, 2000), y proporciona un pronóstico de resistencia a diversas quimioterapias y baja respuesta a tratamientos de radiación e hipertermia en cáncer de mama. Con base en esto, se ha establecido que el valor predictivo de Hsp70, a nivel proteómico, depende no sólo de su expresión sino también de la localización de las células neoplásicas (Vargas-Roig et al., 1998).

5.2. Las sHsp como Promotoras del Cáncer

Estudios diversos demuestran que la Hsp27, perteneciente a la familia de las sHsp, juega un papel importante en una gran variedad de cánceres.

- Niveles altos de Hsp27 son detectados con frecuencia en cáncer mamario (Love y King, 1994; Oesterreich et al., 1993), de próstata (Bubendorf et al., 1999), gástrico (Ehrenfried et al., 1995), de ovario (Langdon et al., 1995) y en el linfoma de Hodgkin (Hsu y Hsu, 1998).
- La Hsp27 se asocia con los receptores esteroides alfa ($ER\alpha$), por lo que se especula que la interacción entre Hsp27 y $ER\alpha$ es uno de los principales mecanismos de promoción de cánceres de mama y endometriales.
- Existe una relación entre la sobre-expresión de Hsp27 con un tiempo más corto de supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama avanzado que han recibido quimioterapia (Vargas-Roig et al., 1998).
- Se considera que niveles altos de Hsp27 le confieran resistencia a las células tumorales contra las defensas del organismo y agentes quimioterapéuticos (Concannon et al., 2003).

Dos estudios realizados en ratones desnudos muestran que Hsp27 está involucrada en la migración celular y que su inducción causa el aumento en el potencial metastático y resistencia a terapias antineoplásicas (Blackburn et al., 1997; Katoh et al., 2000). Debido a que Hsp27 es un regulador importante de los microfilamentos de actina, se deduce que éste

puede ser el mecanismo por el cual la sobre-expresión de Hsp27 se correlaciona con un mayor potencial metastático (Shin et al., 2005).

La proteína α B-cristalina, otro miembro de la familia de las sHsp, juega también un papel importante en el avance del cáncer. En la actualidad, se ha demostrado la sobre-expresión de α B-cristalina en gliomas (Aoyama et al., 1993) carcinoma renal (Pinder et al., 1994), cáncer de mama (Chelouche-Lev, 2004) y carcinoma ductal *in situ* (Wulfschlegel et al., 2002).

Moyano et al. realizaron experimentos en los cuales se indujo la expresión constitutiva de α B-cristalina en las líneas celulares MCF-10A y MCF-12A de epitelio mamario. En estos experimentos se observaron cambios neoplásicos en los que Moyano et al. se basaron para definir a α B-cristalina como una oncoproteína. Los cambios mencionados son:

- Proliferación incrementada e independiente del factor de crecimiento epidermal (EGF) y de la adhesión.
- Pérdida de la polaridad.
- Desorganización en la estructura de actina.
- Disminución de la apoptosis.
- Incremento de la migración e invasión.

En experimentos en los que la expresión de α B-cristalina se suprimió por medio de RNA de interferencia (iRNA), se observó la anulación del fenotipo neoplásico. La transformación de las células de epitelio mamario por la sobreexpresión de α B-cristalina, también parece estar ligada a su

estado de fosforilación debido a que una α B-cristalina mutada y pseudo-fosforilada no es capaz de transformar células. Más aún, sólo los inhibidores de la cascada de MAPK son capaces de detener el proceso de transformación (Moyano et al., 2006), aunque a la fecha no se conoce específicamente cuál es la molécula de la cascada de MAPK encargada de la fosforilación de α B-cristalina.

5.3. Factores Promotores del Cáncer: Hsp70 y Hsp90

Las Hsp70 y Hsp90 pueden regular la actividad de NF- κ B, p53, v-Src, Raf1, Akt y de receptores de hormonas esteroides (Pratt y Toft, 2003), lo cual le confiere a las células tumorales ventajas de supervivencia, protección en contra de las defensas del organismo y una mayor proliferación de células cancerosas (ver figura 3).

La sobre-expresión de Hsp70 se correlaciona con una mayor proliferación de células cancerosas, metástasis, baja diferenciación del tejido y de la respuesta a terapias en diferentes tipos de neoplasias (Ciocca et al., 1993; Vargas-Roig et al., 1998). Por ejemplo, Hsp70 ha sido descrita como una molécula importante en cáncer de mama debido a su participación en el ensamblaje y tráfico de receptores esteroides. Al igual que Hsp27, Hsp70 ha sido encontrada en asociación con ER α (Takahashi, 1994) y es capaz de incrementar la transcripción de dicho receptor y el crecimiento de células MCF-7 de cáncer de mama (Spears y Barnes, 2003). Asimismo, se ha descubierto que Hsp70 se une a p53 mutante en células neoplásicas (Lehmann et al., 1991), este último presente en el 50 por ciento de los casos de cáncer de mama. Esta evidencia podría explicar la elevada

los fibroblastos, redondez y desprendimiento de las células; mientras que el bloqueo de Hsp70-2 provocó una morfología aplanada y larga, semejante a la mostrada en la senectud. La interferencia del RNA de Hsc70 en las mismas líneas celulares provocó una morfología similar a la de los fibroblastos y el desprendimiento tanto de células neoplásicas como de las no tumorales.

- Las células carentes de Hsp70-6 no sufrieron cambio alguno.
- La carencia de Hsp70, Hsp70-2 ó Hsp70-6 no causó ningún cambio en la morfología de las células epiteliales no cancerosas MCF-10A y PNT1A, lo cual indica que este efecto es específico sólo a células neoplásicas.

Otro experimento realizado en células HeLa demostró que:

- La inhibición de la expresión de Hsp70 causa el arresto de las células en la fase G2/M del ciclo celular; mientras que la inhibición de Hsp70-2 causa el arresto en la fase G1 (Figura 4).
- Se confirmó que la falta de Hsp70-2 causa la inducción de varios genes, en especial, el de la citosina inhibidora de macrófagos-1 (MIC-1), la cual a su vez induce al inhibidor de ciclina p21cip, que es la responsable del arresto celular en G1 y de la apoptosis.

Miembros de la familia de Hsp70 pueden también regular los niveles de p53. En ratones nulogénicos para Hsp70-2 los niveles de p53 y su actividad transcripcional, están aumentados. Sin embargo, los efectos de Hsp70 en células neoplásicas no son totalmente dependientes de p53, pues en ausencia de esta proteína, la inhibición de la expresión de Hsp70-2 aún estimula la secreción de MIC-1 y el arresto celular.

En conclusión, se puede decir que Hsp70, Hsp70-2 y Hsc70 están relacionadas con el proceso de transformación celular, al mantener la morfología neoplásica y evadir la apoptosis.

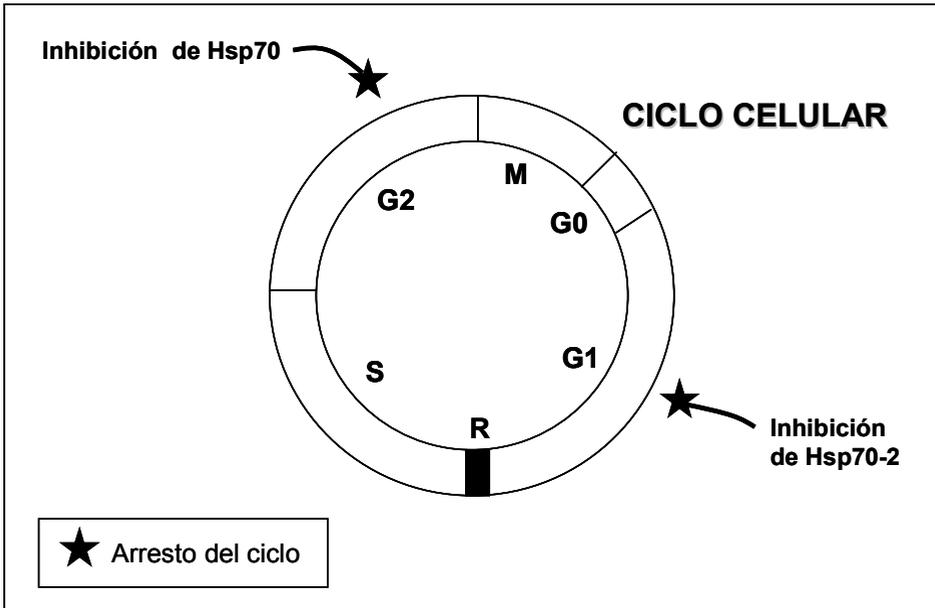


Figura 4. La inhibición de la expresión de Hsp70 ó Hsp70-2 por medio de sus respectivos siRNA causa el arresto celular en dos puntos diferentes del ciclo celular.

Por su parte, se ha propuesto que Hsp90 actúa como promotor de la carcinogénesis a través de cuatro mecanismos diferentes:

- Estabilización de cinasas relacionadas con la supervivencia y proliferación celular, activas durante la transformación maligna. Entre dichas cinasas se encuentran ErbB2, Src, Abl, Met (tirosinas cinasas) o Raf, Akt y cinasas de serina dependientes de ciclina, que al ser estabilizadas por Hsp90 se mantienen en conformación activa.

- Promoción de la maduración de receptores a hormonas nucleares y el factor inducido por hipoxia 1.
- Fomento de la acumulación del factor de supresión tumoral p53 mutado, el cual carece de acción antitumoral. Se ha demostrado que Hsp90 es capaz de unirse a p53 mutante con mayor avidez que a p53 nativo (Blagosklonny et al., 1996), lo cual lo estabiliza y evita su degradación por el proteasoma. Además, se ha observado que p53 mutado eleva resistencia a quimioterapias con fármacos que dañan el DNA.
- Anulación de la apoptosis a través de la inhibición de Apaf-1, descrito en la figura 2.

5.4. Resistencia a Fármacos Antineoplásicos Conferida por sHsp

Algunas Hsp pueden servir como indicadores en la predicción de la respuesta a diversos tratamientos antineoplásicos, dependiendo del tipo de cáncer y su perfil molecular (Ciocca et al., 1993). Este hallazgo es valioso debido a que la determinación del pronóstico de un paciente con cáncer permite responder a las preguntas que él tenga e individualizar tanto el tratamiento como su seguimiento. En la tabla 3 se muestra la relación entre varias Hsp y su valor predictivo para varios tipos de cáncer.

Como se puede observar en la tabla 3, la expresión Hsp70 muestra mal pronóstico en cáncer de mama, endometrial, cervico-uterino, y carcinoma celular transicional de la vejiga, lo que concuerda con la capacidad de

Hsp70 de bloquear la apoptosis (ver figura 2), el incremento en la proliferación de las células y la disminución de la diferenciación.

	Mal pronóstico	Buen pronóstico	Sin relación
Expresión de Hsp27	Cáncer de ovario Cáncer gástrico Cáncer hepático Cáncer prostático Osteosarcomas	Adenocarcinomas endometriales Cáncer esofágico Histiocitomas fibrosos malignos	Cáncer escuamoso de la cabeza Cáncer escuamoso del cuello Cáncer renal Cáncer de vejiga Leucemia
Expresión de Hsp70	Cáncer de mama Cáncer endometrial Cáncer cervicouterino Carcinoma celular transicional de la vejiga	Cáncer esofageal Cáncer pancreático Cáncer renal Melanoma	Cáncer de ovario Cáncer oral Cáncer escuamoso de la cabeza Cáncer escuamoso del cuello Cáncer gástrico Cáncer de próstata Leucemia
Sobreexpresión de Hsp90 y presencia de auto-anticuerpos	Cáncer de mama	-	Cáncer oral Cáncer de ovario
Pérdida de la expresión de ambas Hsp90 y Hsp60	Carcinoma de la vejiga con riesgo de recurrencia invasiva	-	-

Tabla 3. Pronóstico de diversos tipos de cáncer que expresan varias Hsp.

Se especula que el bajo pronóstico asociado a Hsp90 se debe a que pudiera ser chaperona de la oncoproteína HER-2/neu y de p53 mutado, confiriendo protección ante la degradación del proteasoma. En contraste, Hsp90 puede ser chaperona de receptores de progesterona en cáncer de endometrio, contribuyendo a su maduración y manteniendo un fenotipo de tumor más diferenciado, menos agresivo y con mejor respuesta ante agentes progestacionales sintéticos (Ciocca y Calderwood, 2005).

En un estudio realizado por Chauhan et al. (2004), se demostró que Hsp27 es capaz de conferir resistencia a células de mieloma múltiple (MM) ante el fármaco dexametasona. En este experimento ellos emplearon células directamente extraídas de pacientes con MM resistente a la dexametasona y observaron que la única proteína cuyos niveles se encontraban alterados era Hsp27. En células de pacientes sensibles al medicamento, Hsp27 mantiene niveles muy bajos (Chauhan et al., 2004). A través de éste y otros experimentos se han propuesto cuatro mecanismos por medio de los cuales Hsp27 puede conferir resistencia a fármacos quimioterapéuticos (Ciocca y Calderwood, 2005):

1. Las Hsp utilizan su capacidad de chaperonas moleculares para reparar en forma más eficiente las proteínas dañadas a través de la administración de fármacos citotóxicos. Se ha observado que la estabilización del citoesqueleto de actina provocado por Hsp27 es clave en la resistencia a fármacos.
 - Se ha comprobado que Hsp27 se une selectivamente a los filamentos de actina en células de MM resistentes a dexametasona, lo cual estabiliza al citoesqueleto (Chauhan et al., 2004).
 - Al adicionar inhibidores de la unión entre Hsp27 y actina, como el 2-metilestradiol o el inhibidor del proteasoma PS-341, se induce la apoptosis de las células de MM resistentes a dexametasona (Chauhan et al., 2002), sin un cambio en la expresión de Hsp27.

- La inhibición de la expresión de Hsp27 ayuda a inducir la apoptosis y re-establecer la sensibilidad a dexametasona de las células de MM resistentes (Chauhan et al., 2004).
2. Promueve y aumenta la reparación del DNA dañado (Mendez et al., 2003; Nadin et al., 2003).
 3. Ayuda a células cancerosas a evadir la apoptosis (Arrigo et al., 2002). Alteraciones en las cascadas de la apoptosis, crecimiento o supervivencia pueden llevar a las células neoplásicas a adquirir quimioresistencia (Ver capítulo 4.4.4).
 4. Protege la microvasculatura del interior de los tumores. Se ha encontrado que Hsp27 está presente en células endoteliales de la vasculatura que irriga tumores (Ciocca et al., 2003).

Cabe señalar que también el fármaco doxorubicina incrementa la expresión de Hsp27, otras Hsp y los niveles de diversos factores antiapoptóticos (Vargas-Roig et al., 1998). La doxorubicina es un antibiótico indicado en el tratamiento de diversas neoplasias malignas como la enfermedad de Hodgkin, leucemias agudas y tumores de mama. Es por ello que al prescribir este fármaco, se debe tener en cuenta que si no se administran dosis lo suficientemente elevadas, puede incrementar la supervivencia de las células neoplásicas y su resistencia a otros agentes quimioterapéuticos en lugar de promover la disminución del tumor.

5.5. Terapias Antineoplásicas que Utilizan Inhibidores de Hsp

La importancia de las Hsp en la supervivencia de células cancerosas y la proliferación de tumores, han impulsado la investigación y el desarrollo de fármacos nuevos que puedan inhibir su actividad y combatir diversos tipos de cáncer. En la actualidad se encuentran en desarrollo fármacos cuyo blanco son las Hsp, sobretodo en contra de Hsp90 (Neckers e Ivy, 2003). Debido a que las células normales no expresan Hsp90 de manera significativa, se espera que este tipo de fármacos posean una alta selectividad y especificidad a células neoplásicas. Con el empleo de este tipo de fármacos, se espera obtener menor toxicidad que las quimioterapias convencionales.

La inhibición de la actividad de Hsp90 promueve la apoptosis de células tumorales (Sreedhar y Csermely, 2004) y fallas en el funcionamiento de las cascadas de señalización de la proliferación dependientes de Akt (Basso et al., 2002), evitando el crecimiento de células en proliferación activa (Ver figura 3). Además, puede sensibilizar a diversas células tumorales a lisis por hipoxia, ataque del complemento y tratamiento con detergentes suaves (Sreedhar y Csermely, 2004).

Los inhibidores de Hsp90 importantes en las terapias contra el cáncer, incluyen el radicicol, la geldanamicina (Whitesell et al., 1994) y su análogo menos hepatotóxico, el 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17AAG) (Schulte y Neckers, 1998). En condiciones normales, Hsp90 no se encuentra unido a proteínas, es por ello que fármacos como la geldanamicina no afectan el funcionamiento de las células normales

(Ciocca y Calderwood, 2005). El 17AAG ha sobrepasado las pruebas clínicas fase I y hoy se encuentra en fase II (Neckers y Neckers, 2005).

El mecanismo principal por medio del cual actúan los derivados de la geldanamicina es la unión al dominio ATPasa de Hsp90. La especificidad tumoral de los inhibidores de Hsp90 derivados de geldanamicina es regulada por un mecanismo inusual. En células normales Hsp90 se encuentra separada de sus co-chaperonas mientras que en células tumorales se encuentra formando complejos con varias de ellas. Ambos, la geldanamicina y el 17AAG, se unen al sitio de unión de péptidos del extremo amino de Hsp90 y al sitio de unión a ATP, causando la inhibición de la actividad de chaperona de Hsp90 (Workman, 2002).

Se ha demostrado que en células cancerosas, el 17AAG se une de forma específica al complejo Hsp/co-chaperonas de manera 100 veces más afin que al de células normales (Kamal et al., 2003). De hecho, se ha sugerido que Hsp90 activo se comporta como catalizador en la activación de los derivados de geldanamicina en células tumorales (Lee et al., 2004). Cuando la actividad de Hsp90 es inhibida, las proteínas desdobladas por causa del estrés son degradadas por el proteasoma, facilitando la muerte de las células cancerosas.

En estudios clínicos de fase II, se ha demostrado que el 17AAG contribuye a la estabilización de la enfermedad en algunos pacientes, aumenta el nivel de apoptosis y disminuye la proliferación del tumor, aunque con menor potencia que la radioterapia o quimioterapia. A pesar del potencial terapéutico de los inhibidores de Hsp90, existen diversas desventajas:

- El 17AAG es poco soluble, tiene baja biodisponibilidad oral, potencia modesta, y es sustrato de la glicoproteína P.
- La geldanamicina y el 17AAG (Kim et al., 1999; Bagatell et al., 2000) pueden ayudar a la supervivencia de las células tumorales debido a que son capaces de disociar el complejo Hsp90-Hsf1, lo que causa la activación de la transcripción de muchas otras Hsp (ver figura 1); en especial, de Hsp40, Hsp70 y Hsp90 (Sittler et al., 2001).
- Los inhibidores de Hsp90 pueden tener efectos antagónicos con otros fármacos antineoplásicos, por ejemplo con el cisplatino en células de adenocarcinoma de colon (Vasilevskaya et al., 2003).

Zaarur et al. identificaron una estructura clave en la inhibición de Hsp, el anillo tricíclico de 2H-benzo[a]quinolicina (Figura 5). Este anillo se encuentra presente en los fármacos emunina (NZ71), NZ72, NZ28, dihidroemetina e isocefalina. Tanto la emunina como NZ28 aumentan la actividad de inhibidores de Hsp90 en las células MM.1S (mieloma múltiple), PC-3 (carcinoma de próstata), HCT-116 (carcinoma de colon) y en fibroblastos MEF (Zaarur et al., 2006).

En un estudio reciente, donde se utilizaron fármacos que interfieren con la migración celular de la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama, se identificó al compuesto KRIBB3 como inhibidor de la Hsp27 (Shin et al., 2005). Cabe mencionar que el mecanismo de acción del KRIBB3 es la inhibición de la fosforilación de Hsp27 dependiente de PKC, por medio de su unión directa con la proteína en su sitio de activación. De este modo, KRIBB3 es el primer inhibidor de Hsp27 descrito (Shin et al., 2005).

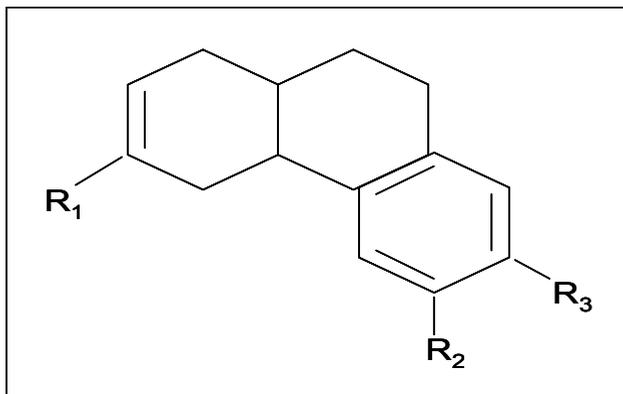


Figura 5. Base estructural responsable de la inhibición de Hsp72 en los fármacos NZ28, emunina (NZ71), NZ72, dihidroemetina e isocefalina.

6. Las Hsp en Inmunoterapia

La estimulación del sistema inmune es otra de las estrategias empleadas en nuevas terapias antineoplásicas. En las últimas décadas, se han estudiado los diferentes antígenos presentes en tumores que pueden hacer que el sistema inmune monte una reacción en contra de ellos. Se ha observado que las Hsp son capaces de desencadenar reacciones inmunes y es por ello que se han señalado como buenos blancos de protocolos inmunoterapéuticos. En este apartado, se presentan algunos aspectos de la respuesta antitumoral y el potencial de las Hsp para inducir reacciones inmunes.

6.1. Antígenos Tumorales como Inductores de la Respuesta Inmune

El sistema inmune es capaz de iniciar una reacción de rechazo ante células o tejidos no reconocidos como propios, a través del reconocimiento de antígenos. Algunas células cancerosas muestran en sus membranas antígenos propios del tumor por medio de los cuales le hacen saber al sistema inmune que están alteradas. Actualmente, se reconocen dos tipos de antígenos tumorales (Boon et al., 1997):

- Antígenos de transplante específicos de tumor (TSTA).
- Antígenos de transplante asociados al tumor (TATA).

Los TSTA son antígenos específicos del tumor, es decir, no se encuentran presentes en tejidos normales. Ejemplos de este tipo de antígenos son las proteínas alteradas por mutación de algún gen o por transcripción o

traducción modificada que resulta en la formación de un polipéptido nuevo, que además es presentado en el complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHCI); el metilcolantreno y el virus del poliooma causan mutaciones que pueden dar origen a TSTA.

La importancia de los TSTA en la respuesta inmune contra tumores se demostró por medio de un experimento en el cual se observó la respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CTL) ante antígenos tumorales. El experimento consistió en obtener células tumorigénicas (*tum*⁺) de ratón por medio de mutaciones químicas y clonación. Después, las clonas se introdujeron en ratones singénicos y se observó la aparición de tumores. Mas tarde, se comprobó que los ratones que no desarrollaron tumor contenían una clona (*tum*⁻) capaz de presentar el antígeno tumoral en la membrana y desencadenar el ataque de las CTL. Esta reacción fue corroborada por medio de un ensayo de lisis utilizando las CTL específicas para el antígeno tumoral aisladas del ratón (Van den Eynde y Van der Bruggen, 1996).

En contraste, los TATA no son antígenos específicos del tumor ya que pueden ser encontrados en tejidos sanos del organismo, pero sólo durante la etapa embrionaria y/o a una muy baja concentración en adultos:

- Debido a que el sistema inmune aún no está desarrollado en el periodo embrionario, estas proteínas no son capaces de desencadenar una reacción inmune durante ese tiempo, sin embargo, cuando se encuentran en células cancerosas de adultos sí pueden ser capaces de desencadenar el rechazo de tumores.

- En células sanas, las proteínas que funcionan como TATA se encuentran en una concentración muy baja mientras que en células cancerosas su concentración es muy alta. Ejemplo de estas proteínas son los factores de crecimiento y sus receptores, como la transferrina p97, cuya cantidad es 60 veces mayor en células de melanoma. Otro ejemplo son los oncogenes, como el receptor de factores de crecimiento Neu, el cual se encuentra elevado en algunos casos de cáncer de mama (Scott y Welt, 1997).

La reacción inmune contra TATA se confirmó mediante un experimento en el cual se vacunó a ratones con un virus que contenía p97. La vacuna desencadenó tanto una reacción humoral como celular y le confirió al ratón protección contra células de melanoma que sobre-expresan p97.

6.1.1. Células del Sistema Inmune que Reconocen Antígenos Tumorales

Las CTL son las encargadas principales de la respuesta antitumoral, a través del reconocimiento de los antígenos TATA o TSTA presentados en MHC I. Sin embargo, existen células cancerosas capaces de inhibir la presentación de MHC I, lo que limita la respuesta de las CTL. En este caso, las células “natural killer” (NK) son de suma importancia. De hecho, ratones que carecen de células NK e individuos con la enfermedad Chediak-Higashi tienen un riesgo mayor de desarrollar linfomas y leucemias (Abbas et al., 2000).

Los macrófagos también juegan un papel importante en la inmunidad tumoral. Tanto las células NK como los macrófagos son capaces de

desencadenar una respuesta inmune ante tumores, ya que son independientes de MHC I. Al poseer receptores al fragmento cristalino (Fc) de los anticuerpos, dichas células pueden cooperar con la respuesta mediada por anticuerpos. Se cree que la respuesta iniciada por los macrófagos es principalmente a través de enzimas líticas, especies reactivas de oxígeno e intermediarios de nitrógeno. Los macrófagos excretan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) al medio, lo que induce la necrosis del tumor. Se ha observado una relación entre macrófagos rodeando un tumor y el rechazo del mismo (Abbas et al., 2000).

6.2. Evasión de Células Neoplásicas al Sistema Inmune

El resultado de diferentes estudios comprobó que las células cancerosas son capaces de desarrollar mecanismos de evasión del sistema inmune, entre los que se encuentran los factores bloqueadores, el retraimiento de los antígenos tumorales y la disminución de la expresión del MHC I (Abbas et al., 2000).

- *Factores bloqueadores.* Los anticuerpos específicos al tumor pueden actuar enmascarando a los antígenos para que no sean reconocidos por las CTL y bloquear los receptores de Fc, inhibiendo la citólisis dirigida por anticuerpos (ADCC), mediada por NK y macrófagos. En diversos estudios en los que se utilizaron anticuerpos específicos para antígenos tumorales se reveló que la inmunización activa en animales causa un incremento en la incidencia de tumores en lugar de una disminución. Esta evidencia fue corroborada después, cuando se comprobó que varios niños con neuroblastoma progresivo contenían

factores bloqueadores de la respuesta inmune en suero (Abbas et al., 2000).

- *Retraimiento de los antígenos tumorales.* Las células cancerosas retiran de la membrana celular proteínas inmunogénicas conforme aumenta el título de anticuerpos específicos a dicho polipéptido en el plasma (Weinberg, 1996).
- *Disminución de la expresión del MHCI.* La inhibición de la expresión en membrana del MHCI y moléculas co-estimuladoras es asociada al proceso de transformación de las células tumorales (Weinberg, 1996), y se relaciona con crecimiento del tumor y un pronóstico de la enfermedad desfavorable. Asimismo, la disminución de la molécula co-estimuladora B7 en células cancerosas provoca anergia clonal, debido a que la activación de los linfocitos T es incompleta (Allison et al., 1995).

6.3. Estrategias Utilizadas en la Inmunoterapia del Cáncer

En la actualidad se exploran terapias antineoplásicas que utilizan la manipulación de señales co-estimuladoras, la estimulación las APC, el aumento de citocinas, uso de anticuerpos monoclonales y adyuvantes.

- *Manipulación de señales co-estimuladoras.* Hace algunos años, se demostró que ratones con melanoma, a los que se inyectaron células de melanoma transfectadas con el gen B7 presentaron regresión de los tumores debido a la estimulación de las CTL. La ausencia de tumores

en ratones sanos inyectados con células de melanoma transfectadas con B7 comprobó que moléculas co-estimuladoras de CTL podrían ser de gran utilidad en el tratamiento post-operatorio para reprimir la metástasis del tumor primario (Allison et al., 1995). Más aún, debido a que los antígenos de las células de melanoma son compartidos por una amplia gama de tumores en humanos, se ha planteado la posibilidad generar un panel de líneas celulares de melanoma transfectadas con B7 tipificadas para la expresión del antígeno tumoral y HLA idóneos para tratamientos específicos (Houghton et al., 2001).

- *Estimulación de las APC.* En un experimento se retiraron células dendríticas (DC) de un ratón y se incubaron con el factor estimulante de colonias de granulocitos en macrófagos (GM-CSF) y fragmentos de tumor. Después, las DC fueron re-inyectadas en el ratón y se observó un aumento en la actividad de las CTL. Finalmente, cuando el ratón fue inyectado con células tumorales, presentó inmunidad (Rosenberg, 2001). Un enfoque similar ha sido transfectar las células tumorales con GM-CSF para aumentar la activación y diferenciación de APC en el organismo (Allison et al., 1995). Otra manera de expandir la población de APC es cultivar las células progenitoras de la sangre periférica en presencia de GM-CSF, TNF- α e IL-4 para generar grandes cantidades de células dendríticas (Rosenberg, 2001). Existe la creencia que después de cultivar las DC obtenidas con fragmentos de tumor y reinyectarlas al paciente, las DC serán capaces de activar a células T cooperadoras y citotóxicas para rechazar al tumor. Sin embargo, para comprobar que esta posibilidad es real, se necesita más investigación al respecto.

- *Aumento de citocinas.* Varias citocinas han sido evaluadas en el tratamiento del cáncer. Entre ellas se encuentran: IFN- α , β y γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, GM-CSF y TNF α . Los interferones han sido utilizados con buenos resultados en terapias contra leucemias, linfomas mielomas, melanoma, sarcoma de Kaposi, cáncer renal y cáncer de mama. Se cree que los interferones son capaces de aumentar la expresión de MHCI en células neoplásicas, así como de activar a CTL, macrófagos y células NK (Rosenberg, 2001). Aunque se han obtenido resultados alentadores, la terapia con citocinas presenta aún algunos inconvenientes:
 - No se ha encontrado una vía de administración local adecuada que carezca del riesgo de causar una distribución sistémica de las citocinas y por lo tanto una reacción inmune del mismo tipo.
 - No se ha determinado el efecto de citocinas administradas sobre la producción de otras citocinas.

- *Uso de anticuerpos monoclonales.* Estos anticuerpos pueden ser utilizados para unirse a TATA o TSTA de células neoplásicas, activando al sistema del complemento y provocando lisis y remisión parcial o total de tumores. En el caso del cáncer de mama, ya ha sido creado y comercializado un anticuerpo, llamado Herceptina, que es capaz de reconocer al receptor de factores de crecimiento HER2 (Scott y Welt, 1997). También se ha investigado una estrategia de “misil guiado” en la cual los anticuerpos específicos están acoplados con agentes quimioterapéuticos que logran una mayor precisión en el tratamiento, reduciendo la toxicidad de la terapia. Sin embargo, el

alcance de las terapias con anticuerpos es limitado, ya que no es posible hacer una generalización acerca del antígeno que un determinado tipo de cáncer presenta en una variedad de pacientes. Es por esto que la terapia debe ser personalizada, lo que impide su aplicación a una extensa cantidad de pacientes.

- *Uso de adyuvantes.* Se refiere al uso de bacterias como *Corynebacterium parvuum*, *Mycobacterium bovis* y el bacilo Clamette-Guerin (BCG). Estos adyuvantes activan a los macrófagos para que secreten diferentes citocinas y expresen moléculas de MHCII y B7. Aunque estos adyuvantes solo muestran resultados terapéuticos moderadamente buenos, sí ayudan a estimular de buena manera a las células T cooperadoras provocando inmunidad humoral (Rosenberg, 2001).

6.4. Participación de las Hsp en la Respuesta Inmune

Debido a la promiscuidad con la cual las Hsp se pueden unir a las proteínas intracelulares, las Hsp pueden servir como grandes acervos que contienen todas las proteínas alteradas, extrañas o desnaturalizadas del interior de una célula, que resultan de un evento de estrés, infección viral e incluso, cáncer. Basados en esta premisa, diversos investigadores han explorado el potencial de las Hsp para desencadenar una respuesta inmune contra tumores.

Los primeros estudios en este campo fueron realizados por De Leo y Srivastava. Ellos realizaron experimentos en los cuales inyectaron a

ratones diferentes porciones de lisados de tumores autólogos. Estos ratones fueron expuestos a tumores en una segunda ocasión para observar si alguna fracción del lisado confería resistencia a los mismos. Encontraron que las Hsp son los componentes de la fracción del lisado capaces de conferir protección a exposiciones subsecuentes al tumor (De Leo y Srivastava, 1985).

Posteriormente se relacionó la actividad de chaperonas intracelulares de las Hsp con su capacidad inmunoestimuladora, ya que se observó que los péptidos contenidos en su interior son indispensables para iniciar una respuesta inmune y generar memoria.

A la fecha, son varias las Hsp que han demostrado inmunogenicidad. Entre ellas se encuentran gp96, Hsp90, Hsp70, Hsp110 y grp170, siempre y cuando sean provenientes de células tumorales. En particular, se ha observado que los miembros de las familias de Hsp60 y Hsp70 son altamente inmunogénicas y pueden ocasionar respuestas de tipo celular y humoral.

6.4.1. Estimulación del Sistema Inmune Innato por Hsp

El sistema inmune innato no sólo es responsable del reconocimiento y eliminación de antígenos extraños, sino también hacia antígenos que se presentan en células dañadas, infectadas, estresadas o transformadas, siempre y cuando cuenten con una “señal de peligro”. A través de diferentes estudios, se ha comprobado que las Hsp son capaces de establecer esta señal a través de su interacción con TLR4 y/o TLR2. La

señal de peligro provocada por la unión de Hsp es transducida por medio del factor nuclear NF κ B, lo que causa un incremento en la secreción de citocinas y la expresión de moléculas co-estimuladoras, lo cual proporciona un efecto adyuvante, independiente del antígeno acarreado por la Hsp.

La primera evidencia de que las Hsp son capaces de desencadenar una reacción inmune de tipo innata fue presentada por Friedland et al. en 1993. Ellos mostraron que Hsp65 (chaperona proveniente de *M. tuberculosis*) estimula la maduración de monocitos humanos y la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Este hallazgo fue confirmado posteriormente con Hsp60 (Peetermans et al., 1993) y Hsp70 (Beagley et al., 1993) micobacteriales, aunque los resultados iniciales pudieron haber sido alterados por contaminación con lipopolisacárido (LPS). Después, Kol et al. (1999) reportaron que Hsp60 originaria de *Chlamidia* sp. o humana activan a macrófagos de manera similar al LPS. Diversos experimentos han mostrado que cuando se introducen Hsp sin unión a péptido antigénico, se induce la expresión y secreción de IL-12, GM-CSF y TNF- α en APC (Suto y Srivastava, 1995); e IL-16, IL-6 y TNF- α en monocitos (Asea et al., 2000) (Figura 6).

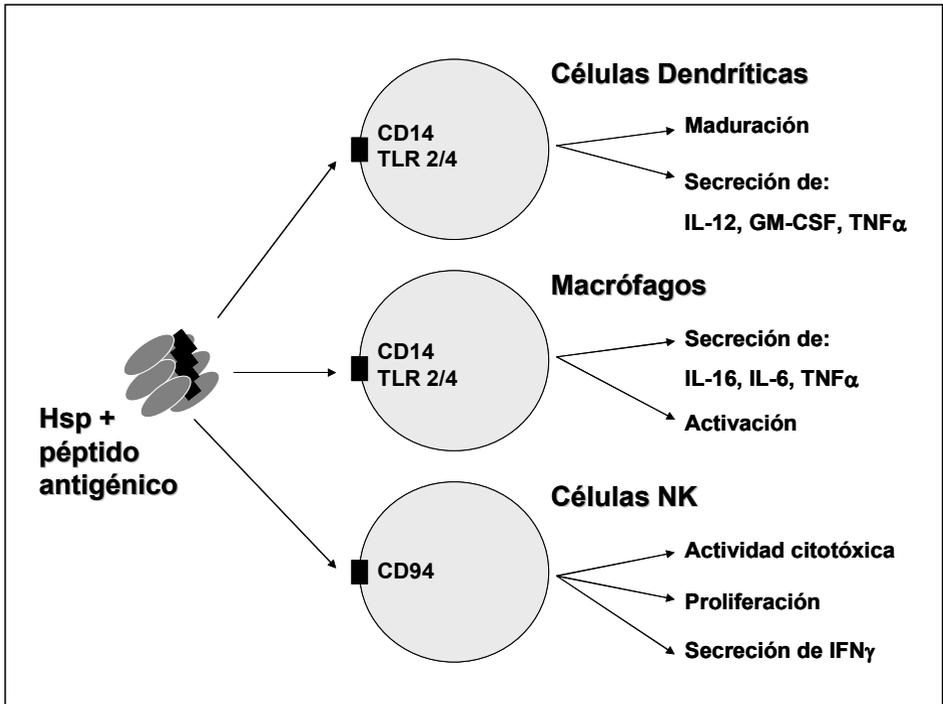


Figura 6. Activación de las células del sistema inmune innato. Las Hsp pueden provocar la secreción de citosinas pro-inflamatorias, de manera independiente al péptido acarreado en su interior.

Se ha acumulado evidencia que indica que la activación de diversas células del sistema inmune es un proceso mediado por la unión de Hsp con receptores específicos y que la producción de citocinas provocada por la unión de Hsp a su receptor respectivo es un efecto adyuvante de gran importancia para generar inmunogenicidad.

En fechas recientes se demostró que la estimulación de la actividad fagocitaria de macrófagos iniciada por Hsp60 es dependiente de los receptores CD14 (Kol et al., 2000) y TLR4 (Ohashi et al, 2000), lo que

indica que Hsp60 es indispensable para la iniciación de las cascadas de señalización de MD2 y MyD88 que regulan el proceso de activación de NF- κ B (Bulut et al., 2002). Se cree que el receptor funcional de Hsp60 es una combinación entre CD14 y TLR4 (Prohászka y Füst, 2004), ya que aún cuando no se ha comprobado interacción entre Hsp60 y estas moléculas, si se ha observado que la iniciación de la traducción de señales coincide con la intervención de Hsp60 (Habich et al., 2002) (Figura 7). Sin embargo, esta chaperona se une a macrófagos y células dendríticas CD14⁺ y TLR⁺ (Lipsker et al., 2002).

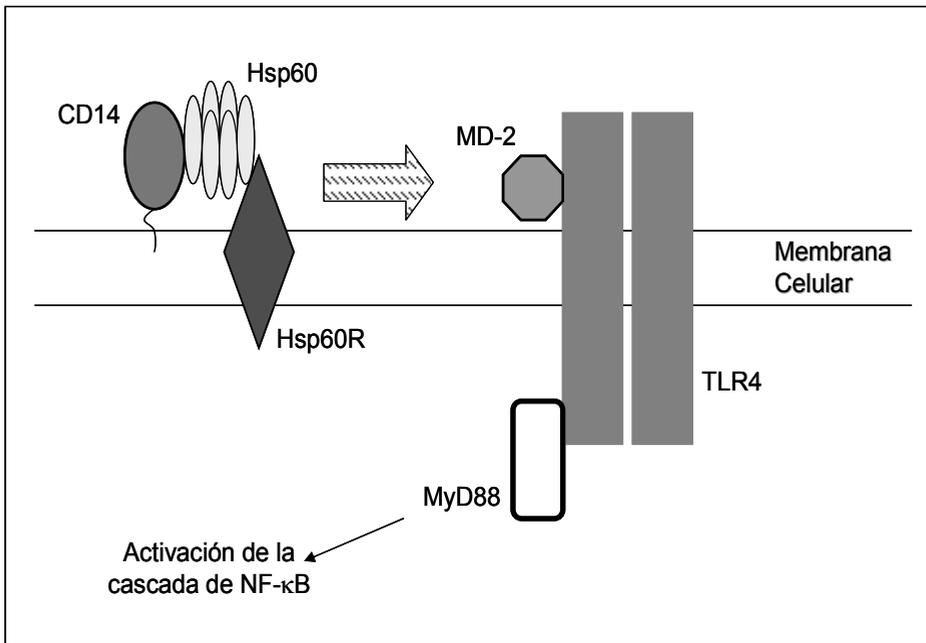


Figura 7. Posible composición del complejo de receptores de Hsp60 en células dendríticas. Se ha propuesto que Hsp60, CD14 y un posible receptor específico a Hsp60 (Hsp60R) forman un complejo que activa a TLR4, lo que resulta en la iniciación de la cascada de señalización de MD-2 y MyD88 (Modelo propuesto por Prohászka y Füst, 2004).

Por su parte, Hsp70 activa a macrófagos vía la cascada de señalización activada por TIR, a través de su unión a los receptores TLR2 y TLR4 (Vabulas et al., 2002).

Se ha encontrado que las Hsp también son adyuvantes endógenos en la maduración de células dendríticas (DC) (Vabulas et al., 2002). En el caso de las DC, la participación de Hsp60 es similar a la de los macrófagos. Habich et al. encontraron que Hsp60 y Hsp70 comparten receptores en DC. En 2001, Sigal et al. propusieron a TLR5 como un receptor probable de Hsp60, ya que encontraron que estas dos comparten estructuras similares (Sigal et al., 2001), lo que incrementa la afinidad entre estas dos moléculas y favorece su unión. Por su parte, Hsp70 induce la maduración de DC y promueve la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD83 y CD86.

Por otro lado, tanto Hsp70 como gp96 promueven la actividad citotóxica de las células NK (Multhoff, 2002). Hsp70 estimula a las NK por medio de su asociación con el receptor CD94 (Gross et al., 2003), mientras que gp96 actúa de manera indirecta para iniciar la secreción de IL-12 de las APC. En pacientes con leucemia mielogénica crónica, la inmunización con un complejo Hsp70-péptido purificado de células de leucemia incrementa la cantidad de NK secretoras de IFN γ en el torrente sanguíneo (Li et al., 2005). Asimismo, gp96 autólogo de cáncer colorectal indujo un aumento significativo en la cantidad de células NK CD3- y CD56-, así como en su actividad (Pilla et al., 2005).

Se ha encontrado que la traducción de señales iniciada con la interacción entre Hsp60 y Hsp70 con receptores TLR y CD14 involucra diversas moléculas (Tabla 4).

Ligando	LPS	Hsp60	Hsp70
Receptor	CD14	Receptor de Hsp60 CD14 TLR4	Receptor de Hsp70 CD14 CD91
Efactor	TLR2	MD2 TLR2 TLR4	MD2 TLR2 TLR4
Blanco	MyD88 IRAK-1	MyD88 IRAK-1 NF- κ B JNK1/2 P38 IKK PKC	MyD88 TRAF-6
Respuesta molecular	Secreción incrementada de IL-1 β , IL-6, TNF α , MIP1 y MIP2	Producción incrementada de TNF α , NO e IL-12 Incremento en la transcripción de moléculas de adhesión	Secreción incrementada de IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF α
Respuesta inmune	Activación de Infocitos T cooperadoras-1	Activación de Infocitos T cooperadoras-1 Producción de inflamación	Activación de Infocitos T cooperadoras-1 Maduración de DC

Tabla 4. Activación del sistema inmune innato por medio de LPS y Hsp vía TLR (Z. Prohászka y G. Füst, Molecular Immunology 2004; 44:29-44).

6.4.2. Inmunidad Adaptativa

Las Hsp, además de iniciar una respuesta innata, también pueden desencadenar una de tipo adaptativa por medio de su interacción con receptores que provocan la fagocitosis de Hsp, seguida del procesamiento de los péptidos para su montaje en MHC. Se ha propuesto que los

receptores CD91 (Basu et al., 2001) y LOX1 (Delneste et al., 2002) son esenciales en este proceso.

El CD91, de la familia de receptores de alfa2-microglobulina (α 2-M), fue en un inicio involucrado con la unión a gp96 (Binder et al., 2000). Después se encontró que es el responsable de la unión y endocitosis de otras Hsp, entre las cuales se encuentran Hsp90, calreticulina (Basu et al, 2001) y Hsp70. En lesiones psoriásicas, se descubrió que Hsp70 es el ligando principal de CD91. Boyman et al. encontraron que dichas lesiones se deben al ataque de las células dendríticas a los queratinocitos de la piel, provocado cuando éstos sobre-expresan Hsp70 y las células dendríticas dermales de la vecindad a CD91 (Boyman et al., 2005). Este receptor puede ser encontrado en la superficie de células descendientes del linaje monocítico: células dendríticas (DC), macrófagos, hepatocitos, fibroblastos y queratinocitos. Su expresión es resultado de la activación de la cascada de señalización de NF κ B y la presencia de TNF α . A través de CD91 se inicia la internalización de las Hsp y la consiguiente producción y excreción de citocinas pro-inflamatorias, concluyendo con la activación de los linfocitos T.

CD91 participa en el procesamiento de péptidos. Cuando la unión entre gp96 y CD91 se lleva a cabo, las Hsp son endocitadas y los péptidos contenidos en gp96 son llevados al retículo endoplásmico y presentados en MHCI y MHCII en la superficie de APC. Además, se estimula la presentación de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF α y GM-CSF. Se cree que la cascada de señalización activada para la secreción de citocinas es la de TLR. Como ya se ha mencionado, el conjunto de eventos posteriores a la unión de

gp96 con CD91 trae como consecuencia la activación de los linfocitos T. Sin embargo, no se inician las funciones efectoras de la inmunidad humoral (Doody et al., 2004). Tanto los receptores de CD91 como LOX-1 se han relacionado con la presentación cruzada de péptidos acarreados por Hsp. Esto se lleva a cabo ya que los antígenos fagocitados son regurgitados al citosol y acarreados por la proteína transportadora TAP hacia la maquinaria de ensamblaje del MHC I (Figura 8).

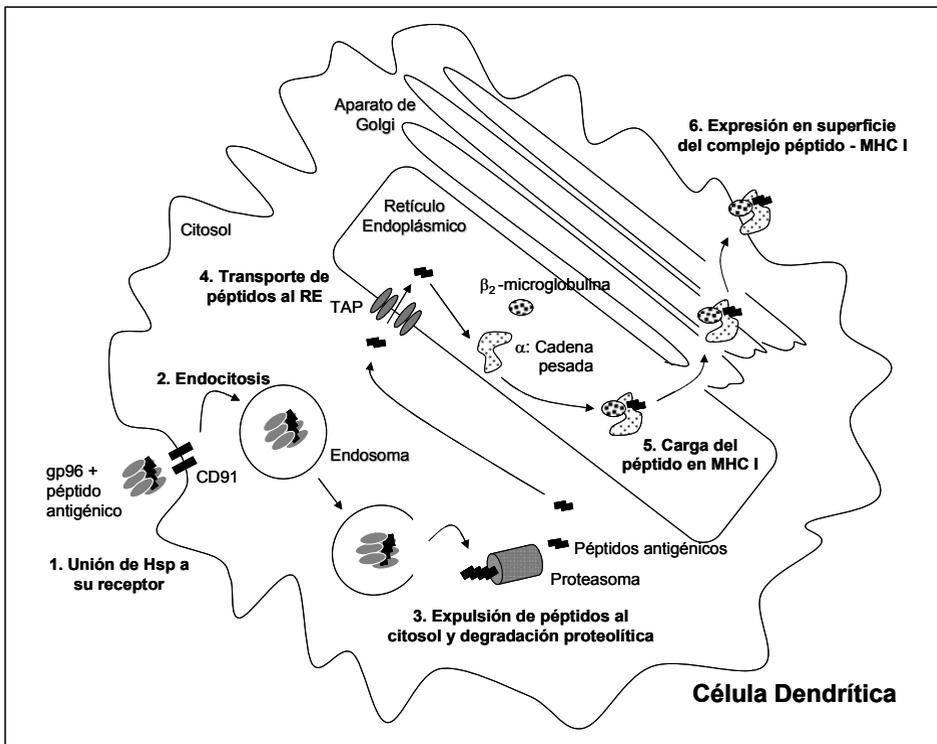


Figura 8. Presentación cruzada de los péptidos antigénicos contenidos en gp96. Modelo propuesto del procesamiento de los péptidos contenidos en las Hsp para su presentación. El montaje de los péptidos en MHC I permite una respuesta celular a través de la activación de los linfocitos T citotóxicos.

Por otro lado, Wang et al. observaron que Hsp70 puede interactuar con las balsas lipídicas* (LR) en la membrana de los macrófagos, las cuales participan en la interacción entre proteínas, la endocitosis mediada por balsas, la traducción de señales y la biogénesis de fagosomas (Dermine et al., 2001). Cuando Hsp70 se une a las LR ocasiona la fagocitosis de antígenos particulados, su procesamiento y su presentación a células CD4+ sólo por medio de MCHII (Wang et al., 2006). Esto se demostró a través de experimentos en donde el contacto de Hsp70 con macrófagos promovió la fagocitosis de hongos, bacterias Gram positivas y negativas, y de microesferas de polietileno. Este descubrimiento permitió observar la gran versatilidad de Hsp70 para interactuar con células del sistema inmune y ser una promotora excelente de la internalización de antígenos y en consecuencia, de la activación de linfocitos T.

Las Hsp pueden, además facilitar el procesamiento de antígenos, incrementar su transcripción en el interior de las APC como consecuencia de su unión a receptores. Se ha encontrado un incremento en la producción de Hsp durante en la diferenciación ó activación de linfocitos T, por mitógenos o citocinas. La asociación directa de Hsp70 ó Hsc70 con la DNAsa activada por caspasas (CAD) incrementa la actividad de las CTL, de tal modo que se incrementa su capacidad de inducir apoptosis mediada por el receptor de células T (TCR) (Liu et al., 2003).

* Las balsas lipídicas son fragmentos o secciones de la membrana celular en donde las cadenas de ácidos grasos saturados favorecen un empaquetamiento apretado.

6.4.3. Inmunización con Extractos de Tumor

La capacidad de unión entre las Hsp con los diferentes receptores celulares en las APC las convierte en excelentes activadoras del sistema inmune, ya que les confiere dos roles:

- Acarreadoras de péptidos antigénicos.
- Generadoras de señales de peligro.

Con base en esto, se ha propuesto que las Hsp pudieran ser buenos vehículos para acarrear los antígenos tumorales desde el interior de las células hasta las APC.

Diversos grupos de profesionales han investigado la efectividad de vacunas que consisten en la fracción de extractos de tumores en los cuales están contenidas varias Hsp. Por medio de esta estrategia se exponen todos los antígenos tumorales contenidos en las Hsp a las APC. La ventaja de esta estrategia es que permite realizar vacunas en las cuales no se tiene que identificar todos y cada uno de los componentes inyectados. Como ya se ha dicho, la antigenicidad de las Hsp y la memoria que inducen en el sistema inmune es específica a los antígenos contenidos en el interior de las mismas; es por ello que este tipo de vacunas pueden ser altamente específicas.

El diseño de vacunas que se basan en Hsp totales de células tumorales posee dos ventajas principales:

- Especificidad hacia el paciente y el tumor.

- Conveniencia de no tener que hacer la exhaustiva labor de reconocer los antígenos particulados del tumor, debido a que las Hsp son capaces de atrapar a todos los péptidos del interior del mismo que funcionan como huellas dactilares.

Se ha comprobado que sólo las Hsp derivadas de tumores generan una respuesta inmune y no así las Hsp purificadas de células normales (Udono y Srivastava, 1993), lo que le brinda a la vacuna selectividad hacia células tumorales. Sin embargo, esta estrategia posee limitaciones, como son:

- La disponibilidad de Hsp que se puede extraer del tumor afecta la cantidad de vacuna aprovechable, la dosis y el esquema de vacunación.
- El tratamiento tiene que ser interrumpido una vez que se ha erradicado el tumor, fuente de las Hsp.
- La purificación de Hsp de tumores es difícil ya que no las muestras siempre son sólidas y no en todos los casos pesan de uno a cinco gramos, características necesarias para preparar suficiente vacuna para un esquema de dosis bajas o al menos 10 gramos, para efectuar un esquema de vacunación riguroso.

Por lo tanto, es difícil planear las dosis y el esquema de vacunación durante el periodo de pruebas clínicas, así como medir la recurrencia de tumores (Massa et al., 2005). Con esta metodología se han obtenido vacunas eficaces para cáncer colorectal, linfomas y mielomas, pero la obtención de vacunas para cáncer gástrico y pancreático ha sido muy

difícil debido a que las Hsp son lisadas durante su purificación por las enzimas proteolíticas de estos órganos (Srivastava y Jaikaria, 2001).

6.4.4. Inmunización con Hsp70 y gp96

Desde el inicio de la década de los 90, se han realizado experimentos que comprueban que las Hsp son capaces de combatir tumores de manera específica. Ensayos realizados con ratones vacunados con Hsp70 ó gp96 purificadas de un tumor previamente extraído, presentan una mayor protección contra exposiciones posteriores a tumores singénicos y una mayor activación de células CD8⁺ (Udono et al., 2004). Por otro lado, se ha demostrado que las células CD4⁺ que son capaces de infiltrarse en los tumores, reaccionan de manera específica con células que expresan Hsp70 en su superficie (Yoshino et al., 1994). El tratamiento de tumores con sustancias alquílicas que estimulan la expresión de Hsp70 en la membrana, resulta en una elevada actividad de lisis por medio de células NK (Botzler et al., 1996). La lisis de células cancerosas de colon y pulmón que expresan a Hsp70 en su membrana es mucho mayor que la de aquellas que no la expresan de manera constitutiva (Botzler et al., 1996).

Geng et al. demostraron en un modelo de ratón que el tratamiento con Hsp70 incrementa el número de linfocitos T que se infiltran en tumores de pulmón. Sin embargo, estos investigadores también demostraron que las células residuales de tumor son capaces de sintetizar B7-H1, molécula que es capaz de ocasionar resistencia a Hsp70. En estudios posteriores se observó que el bloqueo de la expresión de B7-H1 ocasiona rechazo total del tumor (Geng et al., 2006).

Por su parte, Menoret et al. observaron que vacunas de Hsp70 no provocan síntomas de auto inmunidad, aunque encontraron la presencia de IgD e IgM específicos a Hsp70 en bajas cantidades en ratones adultos (Menoret et al., 2000).

Un experimento clave para la comprobación de que gp96 es capaz de combatir tumores establecidos fue realizado por Tamura et al., en 1997. Dicho experimento consistió en inyectar gp96 extraído de células D122 en los cojines de la pata de ratones C57BL/6 con carcinomas preestablecidos, formados a partir de células 3LL (Lewis Lung). Las células 3LL provocan tumores espontáneos no inmunogénicos en el sitio de inyección, mientras las células D122 son una clona altamente metastática de 3LL, la cual establece metástasis en pulmón después de ser introducidas en la pata. Este experimento mostró que:

- gp96 reduce notoriamente el número de metástasis presentes tras la introducción de células D122.
- Los ratones tratados con gp96 tumoral presentaron 10 veces menos tumores metastáticos que los tratados con PBS.
- El ritmo de crecimiento del tumor primario y la eficacia de gp96 en el abatimiento de tumores murinos disminuyen cuando las células CD4⁺ y CD8⁺ son inactivadas por medio de anticuerpos específicos a estas moléculas (Tamura et al., 1997).

En conjunto, estos resultados indican que gp96 requiere de células CD4⁺ y CD8⁺ en la fase efectora de la inmunidad.

Tamura et al. realizaron un experimento de enfermedad residual en el cual se dejó crecer el tumor hasta un tamaño de cinco milímetros y se procedió a remover la totalidad del tumor, dejando a los ratones sólo con micro metástasis (Tamura et al., 1997). Bajo estas condiciones, se observó que los ratones mueren a los 45 días. Sin embargo, al administrar gp96 en un esquema de dosificación de una vez por semana, durante un mes se logró que 80 por ciento de los ratones sobrevivieran hasta 250 días después de la cirugía de escisión del tumor, sin lesiones detectables.

El experimento de Tamura et al. fue realizado después en diferentes modelos celulares de cáncer, en donde se utilizó gp96 autólogo en la inmunización. Por medio de estos ensayos se comprobó la eficacia de esta proteína de choque térmico en melanoma (B16F10), carcinoma de células fusiformes (6139), fibrosarcoma (MethA) y carcinoma de colon (CT26), en los cuales se observó una reducción de la tasa de crecimiento del tumor primario y un incremento en la tasa de supervivencia.

En un experimento separado, inmunizaciones realizadas en ratones adultos con gp96 extraído de tumores autólogos no demostró efectos significativos de auto inmunidad. Sin embargo, si se detectó la existencia de auto anticuerpos IgD contra gp96 en suero. Para confirmar la formación de anticuerpos contra gp96, se inmunizó a ratones adultos sanos con esta proteína, lo cual no causó una respuesta humoral de IgD, cambios de isotipo, toxicidad ni auto inmunidad patológica (Menoret et al., 2000).

Los resultados obtenidos con vacunas de gp96 en pruebas preclínicas son alentadores. Es por ello que la vacuna con esta Hsp unida a péptidos

antigénicos extraídos de tumores ha pasado a fases clínicas para carcinoma renal, melanoma, cáncer gastrointestinal, pancreático y linfoma (Oki y Younes, 2004). En estas pruebas, la vacunación de pacientes es posterior a cirugías de escisión de tumores y sólo cinco por ciento de los pacientes tratados con gp96 han presentado efectos secundarios, entre los cuales se encuentran fiebre, dolor de cabeza, debilidad, piel erizada, erupciones y dolor muscular.

6.5. Incremento del Potencial Inmunogénico de Varias Hsp a Través de Modificación Genética

El potencial antimetastásico e inmunoestimulante de las Hsp las hace buenas candidatas para terapias anticancerígenas. Una de las estrategias utilizadas consistió en crear proteínas de fusión, entre Hsp65 de origen micobacterial y ovoalbúmina o la nucleoproteína del virus de la influenza. Ambas proteínas recombinantes originaron la presentación de MHCI y la activación de CTL específicas (Suzue et al., 1997). En conjunto, estos hallazgos indican que las Hsp recombinantes unidas a antígenos tumorales y aplicadas de manera exógena pueden promover la presentación de los antígenos tumorales en MHC e inducir una respuesta específica de CTL.

En un experimento publicado en 2006, Li et al. reportaron que el antígeno tumoral MUC1 unido con la proteína Hsp65 extraída del Bacilo Calmette-Guérin inhibe significativamente el crecimiento de tumores que expresan MUC1 al inducir la actividad específica de CTL, mientras que Hsp65 provoca una respuesta inespecífica. MUC1, que es un antígeno tumoral altamente inmunogénico, es capaz de desencadenar una respuesta inmune

inespecífica. Además, la inmunización profiláctica con Hsp65-MUC1 induce la inhibición de tumores implantados en forma subsecuente y prolonga la vida de ratones que ya poseen un tumor (Li et al., 2006).

La estrategia de crear péptidos recombinantes que contengan a Hsp unido a algún antígeno inmunogénico es altamente laboriosa y requiere de estudios previos donde se identifiquen los antígenos tumorales que logran desencadenar reacciones inmunes específicas. A pesar de estas limitantes, dichas estrategias han abierto el camino a la creación de otras especies de Hsp quiméricas con un mayor potencial terapéutico, las cuales serán discutidas al final de este capítulo.

6.5.1. Contacto de las Hsp con Células del Sistema Inmune

Los experimentos descritos en los apartados anteriores sugieren que los péptidos antigénicos de la célula son capaces de generar una respuesta inmune, sin embargo, todavía existe el problema de explicar cómo es que las Hsp unidas a péptido pueden salir del interior de la célula para entrar en contacto con las APC, ya que son muy pocos los casos en los que las Hsp están presentes en la membrana de las células tumorales. En diferentes estudios, se han utilizado proteínas recombinantes que son capaces de acarrear antígenos a la membrana para facilitar su exposición a las células del sistema inmune y activar su respuesta.

Experimentos realizados en fibroblastos motiles han demostrado que Hsp70 se puede relocalizar en el sitio de elongación de la membrana durante su migración (Lathangue y Latchman, 1988). Sin embargo, el

mecanismo de transporte de Hsp70 a la membrana no ha sido identificado aún.

Una teoría es que el extremo carboxilo posee una serie de péptidos que le permiten unirse al retículo endoplásmico (motivo KDEL), donde las proteínas de la membrana son empaquetadas para posteriormente ser enviadas a la membrana. Aunque varios miembros de la familia de Hsp70 poseen esta serie de péptidos, la mayoría de las proteínas de esta familia no poseen ninguna porción que les permita transitar hasta la membrana. No obstante, se ha observado que Hsp72 y Hsp73 no poseen el motivo KDEL en el extremo carboxilo y aún así son capaces de localizarse en la membrana de la célula.

Hightower y Guidon realizaron varios experimentos para determinar si inhibidores del transporte de proteínas a la membrana eran capaces de disminuir la presencia de Hsp70 en la misma (Hightower y Guidon, 1989). En estos experimentos se utilizaron brefeldina A, monensina y colchicina (Hightower y Guidon, 1989), el primero inhibidor del transporte a través del retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Misumi et al., 1986), y los dos segundos del sistema secretor de proteínas que poseen péptidos señal hidrofóbicos. En forma inesperada, los resultados obtenidos por Hightower y Guidon muestran que los inhibidores utilizados no son capaces de modificar la localización de Hsp70 en la membrana. Estos resultados parecen indicar que el transporte hacia la membrana de Hsp70 se realiza de manera independiente al sistema de transporte del Golgi.

Se cree que Hsp70 puede ser transportada a la membrana por medio de los mecanismos siguientes:

- Unida a un complejo proteínico de mayor tamaño. Varios miembros de esta familia son capaces de unirse a vesículas de clatrina y a elementos del citoesqueleto (Ohtsuka et al., 1986), de manera que ellos pudieran ser responsables del transporte de Hsp70 hacia la membrana.
- Por medio de la afinidad que le confiere su porción hidrofóbica con los ácidos grasos de la membrana. (Hightower y Guidon, 1989).
- A través de su unión a receptores de membrana, los cuales poseen un sistema de transporte propio. Se ha encontrado que la Hsp70 se une al receptor de transferrina durante la maduración de los reticulocitos (Raulston et al., 1993). Asimismo, se ha involucrado a Hsp70 en la endocitosis de *Chlamydia trachomatis* por células epiteliales endometriales (Raulston et al., 1993).
- Mediante la alteración de su sistema de transporte en células con patologías. Se ha observado que la expresión de Hsp70 aumenta en la membrana de algunas células infectadas con virus o bacterias y células tumorales, pero no en células normales.
- A través de la disminución del pH en la célula, ocasionada por hipoxia, acidez o falta de nutrientes (Vaupel et al., 1989), lo cual podría ocasionar un cambio conformacional en Hsp70 que la hiciera más afín a la membrana.

La localización de Hsp70 en la membrana celular posiblemente permite una mayor absorción de granzima B que transita a través de Hsp70 de manera independiente a la perforina (Gross et al., 2003), lo que aumentaría la efectividad de las CTL (Dressel et al., 2000).

Otra manera de lograr la exposición de las Hsp a las células del sistema inmune es favoreciendo la necrosis, en la cual la célula lisada libera al espacio extracelular su contenido, que incluye a las Hsp y los antígenos que acarrean. En el desarrollo del cáncer y en especial, en etapas de progresión e invasión, la hipoxia y falta de nutrientes hace más frecuente la necrosis de las células, lo que a su vez ocasiona que las Hsp sean expuestas al sistema inmune. Las Hsp lanzadas fuera de la célula durante la necrosis atraen a las APC, principalmente a las células dendríticas, las cuales secretan al medio sustancias pro-inflamatorias que desencadenan una respuesta celular, por parte de CTL y NK.

En un estudio, realizado por Mortaz et al., se comprobó que el choque térmico y el ácido acetilsalicílico inducen la expresión y excreción selectiva de Hsp70 de las células cebadas murinas, mismas que están involucradas en la inmunidad mediada por IgE en reacciones alérgicas y en la inmunidad celular innata. Cuando Hsp70 está localizado en el espacio extracelular, es capaz de activar a otras células cebadas para que produzcan las citocinas TNF- α e IL-6, a través de la activación de la cascada de un receptor de tipo TLR (Mortaz et al., 2005).

6.5.2. Creación de Hsp70 y gp96 Membranal y Secretado por Medio de Ingeniería Genética

Para apoyar el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas, varios investigadores han recurrido a la ingeniería genética para crear nuevas Hsp que sean capaces de salir de células tumorales y así entrar en contacto con el sistema inmune.

Massa et al. crearon una proteína recombinante de Hsp70 y el dominio constante de la cadena ligera kappa de la inmunoglobulina (Cκ) murinas. Esta proteína constituye una forma secretable de Hsp70 que es capaz de interactuar con APC. Esta proteína fue transfectada a células COS-7, donde se confirmó que la proteína quimérica se encuentra en la vía secretora de las células. La Hsp70Cκ puede ser internalizada, *in vitro*, por las APC (Massa et al., 2004). Una vez obtenidos los datos anteriores, se prosiguió a evaluar la respuesta citolítica específica en tumores que secretan Hsp70Cκ. La actividad citolítica aumenta significativamente cuando las células cancerosas secretan Hsp70Cκ. El cambio en la expresión de Hsp de molécula citoplasmática a molécula secretada no afectó su capacidad de unión a antígenos tumorales. Finalmente, la unión de APC con Hsp70Cκ provoca la presentación de B7, que activa a los linfocitos T (Massa et al., 2004).

Hauser et al. construyeron una vacuna de DNA que expresa una forma secretable de Hsp70 compuesta por Hsp70 de origen micobacterial y la proteína E7 del virus del papiloma humano (HPV), denominada HPV-E7-Hsp70. Para ello, se construyó un gen conformado por el gen de la

proteína E7 fusionado al de Hsp70 y precedido por una secuencia líder. Cuando los ratones son inmunizados con este gen, el DNA es tomado por diversas células, las cuales empiezan a secretar a HPV-E7-Hsp70 y estimulan, a través de su porción de Hsp, a las DC. Esta vacuna también estimula fuertemente a células CD8⁺ y a los linfocitos B de manera específica. Este grupo de investigación también demostró que esta vacuna es eficaz tanto en la eliminación de tumores ocasionados por el HPV, así como de otros tumores establecidos en ratones (Hauser et al., 2004).

En el caso de gp96 se utilizó una estrategia diferente. Para poder presentarla en la membrana de las células tumorales, se hizo una modificación en su estructura. En condiciones normales, gp96 es residente del retículo endoplásmico, debido a que posee el péptido señal KDEL. Para promover su presentación en la membrana, dicho péptido fue removido y en su lugar, se le añadió el dominio transmembranal del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PGDF) (Zheng et al., 2001). A través de clasificación celular activada por fluorescencia, se comprobó que la expresión de gp96 en la membrana de las células MethA de fibrosarcoma y CT-26 de cáncer de colon fue exitosa.

Cuando las células tumorales transfectadas con gp96 membranar se expusieron a DC inmaduras fueron capaces de estimular su maduración, así como la presentación de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, y al MHC clase I y II. Las células dendríticas maduras secretaron las citocinas pro-inflamatorias IL-12, IL-1 β y la quimiocina MCP-1 (Zheng et al., 2001). Aunque este estudio no excluye la posibilidad de que otras proteínas puedan estar involucradas con la activación de las DC, sí

prueba que la expresión en la membrana de gp96 tiene una alta relación con el fenómeno observado.

En un experimento en el cual se inyectaron células MethA con gp96 membranal a ratones BALB/c se comprobó que se da un rechazo del tumor por medio de linfocitos T. Lo más importante, es que este experimento también demostró que cuando se inyectan células MethA con gp96 mezcladas con células MethA sin alteraciones, ambos tipos celulares son eliminados; y cuando se inocularon células MethA con gp96 en una extremidad y MethA sin alterar, en la otra extremidad de un mismo ratón, hubo rechazo de ambos tumores.

Debido a que gp96 es tan inmunogénico como Hsp70, Di Paolo et al. exploraron la posibilidad de que gp96 secretado pudiera tener la misma capacidad antitumoral de Hsp70Cκ. Para ello, construyeron un virus oncolítico cuya replicación sólo es viable en células tumorales, que además contiene una forma secretable de gp96 (Di Paolo et al., 2006). La lisis viral es una estrategia útil en el combate de tumores, que se ha utilizado con anterioridad empleando adenovirus modificados que carecen del gen E1, responsable hacer que la célula pase a la fase S del ciclo celular, por lo que el virus queda condicionado a replicarse únicamente cuando las células se encuentren en la fase M del ciclo celular. Se ha observado que esta estrategia causa la regresión de tumores de manera proporcional con el aumento en el título del virus en la sangre (Madara et al., 2005). El estudio de Di Paolo et al. demuestra que una forma secretada de gp96 tiene una fuerte actividad inmunoestimuladora de los linfocitos T. Sus resultados indican que la oncolisis viral y la expresión de gp96

mediada por adenovirus dependen del tipo de tumor y el mecanismo por medio del cual las células tumorales mueren (Di Paolo et al., 2006).

En definitiva, la expresión de Hsp en la membrana y la creación de una forma secretada vencen el obstáculo de poner a las Hsp en contacto con las células tumorales. Además, estos métodos son altamente específicos a neoplasias por lo que se espera que su toxicidad sea baja. Aunque es laborioso, estos métodos representan para el paciente la ventaja de tener la opción de una terapia personalizada.

7. Discusión

Las funciones de las Hsp en las células son importantes en:

- *El mantenimiento de la homeostasis celular.* El rol regulador de las Hsp está relacionado de manera intrínseca a su estructura y su habilidad para interactuar con sustratos polipeptídicos (Georgopoulos y Welch, 1993), ya que en su función como chaperonas son las encargadas de facilitar el transporte, plegamiento y ensamblaje de polipéptidos (Concannon et al, 2003).
- *La supervivencia de la célula durante el estrés celular.* Las Hsp se unen a proteínas desnaturalizadas, previenen el daño de los ROS y regulan el citoesqueleto de actina y la apoptosis (Nadeau et al., 1993), facilitando la supervivencia de las células.

Mientras que estas características brindan citoprotección a células sanas, en las neoplásicas contribuyen a la adquisición de facultades como evasión de la apoptosis, migración y proliferación acelerada (Concannon et al., 2003; Vargas-Roig et al., 1998; Blackburn et al., 1997; Katoh et al., 2000; Pratt y Toft, 2003; Ciocca et al., 1993; Spears y Barnes, 2003; Blagosklonny et al., 1996).

Se ha observado que las Hsp también poseen la capacidad de activar a las células del sistema inmune (De Leo y Srivastava, 1985; Heufelder et al., 1992; Peetermans et al., 1993; Beagley et al., 1993; Suto y Srivastava, 1995; Asea et al., 2000; Bulut et al., 2002; Prohászka y Füst, 2004; Lipsker et al., 2002). Como es bien sabido, el desencadenamiento de la

respuesta inmune es complejo y altamente regulado. Para que los linfocitos B y T inicien reacciones, es necesario que les sean proporcionados péptidos antigénicos, señales de peligro (p.e. citocinas pro-inflamatorias) y señales co-estimuladoras (p.e. B7). En la ausencia de alguno de estos estímulos, la activación de los linfocitos es incompleta y se provoca anergia clonal.

La ventaja de las Hsp es que poseen la capacidad de ser acarreadoras de antígeno y señales de peligro al mismo tiempo, ya que poseen:

- La capacidad de acarrear antígenos tumorales e introducirlos a APC para su procesamiento en MHC. Esta característica de las Hsp está intrínsecamente relacionada a su ubicuidad y versatilidad de tamaño y estructura, lo que les proporciona la capacidad de unirse de manera virtual a todos los péptidos contenidos en el interior de las células cancerosas (Freeman et al., 1995).
- Especificidad de unión a receptores TLR, lo cual estimula la secreción de citocinas y moléculas co-estimuladoras (Friedland et al., 1993; Peetermans et al., 1993; Suto y Srivastava, 1995; Ohashi et al., 2000).

En las células cancerosas existen pocas moléculas capaces de hacer reaccionar al sistema inmune. Lo que distingue a las Hsp tumorales de las provenientes de tejidos sanos, es el péptido contenido en su interior, lo que significa que las Hsp no son inmunogénicas por si mismas (a menos que sean provenientes de bacterias), sino en conjunto con los péptidos antigénicos de su interior (Udono y Srivastava, 1993). De esto se deriva una afirmación importante:

Las Hsp que se llegan a localizar en la membrana de células sanas no generan respuesta inmune debido a la baja densidad a la que se encuentran y que los péptidos de su interior no son inmunogénicos.

En muchos casos, el incremento en la producción de Hsp se relaciona con el estado neoplásico. Esto podría explicar el porqué sólo cuando la célula ha atravesado un proceso neoplásico, se aumenta de manera significativa la presentación de Hsp en su membrana, lo que llama la atención del sistema inmune.

A la fecha es claro que el mayor potencial terapéutico de las Hsp consiste en utilizarlas como acarreadoras de péptidos antigénicos hasta las APC. Las Hsp son capaces de ayudar a que los péptidos contenidos en su interior sean presentados en MHC, lo cual ayuda a desencadenar una respuesta específica de las células T. Además, las Hsp pueden de generar una respuesta inespecífica de células NK, macrófagos y DC.

Las vacunas que se componen de extractos tumorales que poseen la fracción de Hsp han demostrado buena eficacia tanto en el laboratorio como en la clínica (Udono y Srivastava, 1993). En la búsqueda de formas de terapia personalizadas, estas vacunas parecen tener un buen futuro como adyuvantes en el tratamiento de diferentes neoplasias. Sin embargo, las limitantes que poseen todavía son mayores a los beneficios, ya que la tarea de purificar Hsp de un tumor es laboriosa y tardada, y no hay posibilidad de reabastecimiento sin la aparición de nuevos tumores.

La alternativa, que es la creación de proteínas que se componen de la fusión entre péptidos tumorales y Hsp purificadas de bacterias, posee la

restricción de limitarse a la utilización de péptidos que se sabe son antígenos tumorales (Udono et al., 2004).

Sin embargo, para aprovechar la inmunogenicidad de las Hsp, resulta inconveniente esperar en forma pasiva a que ellas sean liberadas de la célula por medio de procesos de necrosis o que sean presentadas en la membrana de alguna célula tumoral. Es por ello que, con el propósito de lograr una mejor exposición a células del sistema inmune, se han desarrollado estrategias que utilizan la ingeniería genética.

La modificación en el contenido de Hsp en tumores a través de terapia génica, preserva las ventajas ofrecidas por las vacunas con Hsp purificadas de tumores, ya que permiten la presentación de un amplio espectro de péptidos antigénicos contenidos en el interior del tumor, al sistema inmune con la ventaja de que se omite el proceso de purificación (Li et al., 2006). Para evitar la citoprotección otorgada a través de la transfección de Hsp por medio de terapias génicas, se han desarrollado proteínas modificadas como gp96 secretado (Yamazaki et al., 1999; Baker-LePain et al., 2002) y Hsp70 membranal (Chen et al., 2002) y secretado (Massa et al., 2004), las cuales, al no residir en el retículo endoplásmico y citosol, respectivamente, pierden su actividad antiapoptótica y son capaces de estimular al sistema inmune causando rechazo del tumor.

8. Conclusiones

- ~ Las funciones de las Hsp son importantes para mantener la homeostasis y supervivencia de la célula ante situaciones de estrés.
- ~ Las funciones de las Hsp relacionadas con la respuesta al estrés, entre las cuales se encuentran la evasión de la apoptosis y la estabilización del citoesqueleto, pueden ayudar a la supervivencia, migración y proliferación de células cancerosas, promoviendo la progresión de carcinomas.
- ~ En ciertos casos, la presencia de Hsp en biopsias de tejidos posee un valor predictivo importante. Aunque por si mismas las Hsp no son útiles en el diagnóstico del cáncer, sus niveles ayudan a determinar el pronóstico de diversos tipos de cáncer, así como su reacción a los tratamientos quimioterapéuticos de uso común.
- ~ Dado que Hsp27 tiene un rol importante tanto en la inhibición de la apoptosis como en el desarrollo de varios tipos de cáncer, es posible que el desarrollo de inhibidores de Hsp27 sea una estrategia que tenga resultados tan buenos como los obtenidos con inhibidores de Hsp90. Esto podría constituir una buena alternativa como adyuvante de las terapias antineoplásicas contra cánceres de ovario, hepáticos, gástricos y osteosarcomas, donde Hsp27 se encuentra sobreexpresado.

Cabe mencionar que aunque los inhibidores de Hsp90 han demostrado buena eficacia en el combate de tumores, es necesario estudiar más a fondo los efectos negativos de la geldanamicina en células sanas, para

confirmar que el uso de dicho fármaco no interfiere en la capacidad de las células sanas de responder en forma adecuada contra el estrés.

- ~ Ya sea que las Hsp estén localizadas en la membrana o sean secretadas de las células tumorales, son buenos señuelos para que las células del sistema inmune puedan identificar y montar una reacción en contra de neoplasias.
- ~ Las Hsp son excelentes activadoras del sistema inmune, por lo que pueden ser un arma muy eficaz en el mejoramiento de las nuevas inmunoterapias antineoplásicas, confiriendo mayor especificidad hacia diversos tipos de cáncer y contribuyendo a personalizar las terapias de acuerdo al paciente.

Aunque las sHsp son las que se encuentran presentes de una manera más notoria en la reacción ante el estrés, son las proteínas Hsp70 y gp96 las que poseen las mejores posibilidades de ser blancos de inmunoterapias en contra del cáncer. Vacunas con estas Hsp activan tanto al sistema inmune adaptativo como innato, con posible inducción de memoria, útil en combatir el relapso de tumores o la aparición de metástasis.

Como en todas las terapias en desarrollo, es importante considerar que estas vacunas se limitan a tumores pequeños o en fases tempranas de crecimiento, ya que el sistema inmune no es capaz de eliminar masas tumorales muy grandes. Sin embargo, pueden ser muy útiles en el combate de las micrometástasis, las responsables del surgimiento de metástasis tras cirugías de escisión de tumores.

Referencias

- 1) Andley U.P., Song Z., Wawrousek E.F., Brady J.P., Bassnett S., Fleming T.P. Lens Epithelial Cells Derived from AlphaB-crystallin Knockout Mice Demonstrate Hyperproliferation and Genomic Instability. *FASEB J.* 2001; 15:221-229.
- 2) Abbott A. The society of proteins. *Nature.* 2002; 417:109.
- 3) Ahn S.-G., Thiele D.J. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* 2003; 17:516–528.
- 4) Ali A., Bharadwaj S., O'Carroll R., Ovsenek N. Hsp90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell Biol.* 1998; 18:4949–4960.
- 5) Allison J.P., Hurwitz A.A., Leach D.R. Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 7:682.
- 6) Ananthan J., Goldberg A.L., Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science.* 1986; 232:522–524.
- 7) Andley U.P., Song Z., Wawrousek E.F., Fleming T.P., Bassnett S. Differential protective activity of alpha A- and alphaB-crystallin in lens epithelial cells. *J. Biol.Chem.* 2000; 275:36823-36831.
- 8) Aoyama A., et al. Expression of alpha B-crystallin in human brain tumors. *Int. J. Cancer.* 1993; 55:760-764.
- 9) Arrigo A.P. sHsp as novel regulators of programmed cell death and tumorigenicity. *Pathol. Biol. (Paris).* 2000; 48:280–288.
- 10) Arrigo A.-P., Paul C., Duchase C., et al. Small stress proteins: novel negative modulators of apoptosis induced independently of reactive oxygen species. *Prog. Mol. Subcell Biol.* 2002; 28:185–204.

- 11) Arrigo A.P., Welch W.J. Characterization and purification of the small 28000-dalton mammalian heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:15359-15369.
- 12) Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A., et al. Hsp70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* 2000; 6:435-442.
- 13) Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A., Stevenson M.A., Chen L.B., Finberg R.W., Koo G.C., Calderwood S.K. Hsp70 Stimulates Cytokine Production through CD14-dependant Pathway, demonstrating its Dual Role as a Chaperone and Cytokine. *Nat. Med.* 2000; 6:435-442.
- 14) Bagatell R., Paine-Murrieta G.D., Taylor C.W., Pulcini E.J., Akinaga S., Benjamin I.J., Whitesell L. Induction of heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6:3312-3318.
- 15) Baker-LePain J.C., Sarzotti M., Fields T.A., Li C.Y., Niccitta C.V. GRP94 (gp96) and GRP94 N-terminal geldanamycin binding domain elicit tissue nonrestricted tumor suppression. *J. Immunol.* 2001; 167:6731-6735.
- 16) Baler R., Dahl G., Voellmy R. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor Hsf1. *Mol. Cell Biol.* 1993; 13:2486-2496.
- 17) Ballinger C.A., Connell P., Wu Y., Hu Z., Thompson L.J., Yin L.Y., Patterson C. Identification of Chip, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19:4535-4545.
- 18) Basso A.D., Solit D.B., Chiosis G., Giri B., Tsihchlis P., Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:39858-39866.

- 19) Basu S., Binder R.J., Rmalingan T., Srivastava P.K. CD91 is a common receptor for Heat Shock Proteins gp96, Hsp90, Hsp70 y calreticulin. *Immunity*. 2001; 14:303-313.
- 20) Beagley K. W. et al. The mycobacterium tuberculosis 71-kDa heat-shock protein induces proliferation and cytokine secretion by murine gut intraepithelial lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23:2049-2052.
- 21) Beere H. M., Wolf B. B., Cain K., Kuwana T., Tailor P., Morimoto R. I., Cohen G., Green D. R. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2:469-475.
- 22) Beere H.M., Green D.R. Stress Management – heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2001; 11:6-10.
- 23) Beere H. The stress of dying: The role of heat shock proteins in regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* 2004; 117:2641-2651.
- 24) Benndorf R., Hayess K., Ryazantsev S., Wieske M., Behlke J., Lutsch G. Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:20780–20784.
- 25) Benndorf R., Sun X., Gilmont R.R. Hsp22, a new member of the small heat shock protein superfamily, interacts with mimic of phosphorylated Hsp27 ((3D)Hsp27). *J. Biol. Chem.* 2001; 276:26753-26761.
- 26) Bharadwaj S., Ali A., Ovsenek N. Multiple components of the Hsp90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 in vivo. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19:8033–8041.
- 27) Binder R.J., Han D.K., Srivastava P.K. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nature Immunol.* 2000; 1(2):151-155.
- 28) Biro K., Jednakovits A., Kukorelli T., Hedgedus E., Koranyi L. Bimoclolmol (BRLP-42) ameliorates peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res. Bull.* 1997; 44:259-263.

- 29) Biro K., Palhalmi J., Toth A.J., Kukorelli T., Juhasz G. Bimoclolmol improves early electrophysiological signs of retinopathy in diabetic rats. *Neuroreport*. 1998; 9:2029-2033.
- 30) Blackburn R.V., Galoforo S.S., Berns C.M., et al. Comparison of tumor growth between hsp25- and hsp27-transfected murine L929 cells in nude mice. *Int. J. Cancer*. 1997; 72:871-877.
- 31) Blagosklonny M.V., Toretsky J., Bohlen S., Neckers L. Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93:8379-8383.
- 32) Boelens W.C., Croes Y., de Jong W.W. Interaction Between α -crystallin and the Human 20S Proteasomal Subunit C8/ α 7. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001; 1544:311-319.
- 33) Boelens W.C., Van Boekel M.A., De Jong W.W. HspB3, the most deviating of the six known human small heat shock proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1998; 1388:513-516.
- 34) Boon T., Coulie P.G., Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol. Today*. 1997; 18:267-268.
- 35) Botzler C., Issels R., Multhoff G. Heat shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased selectivity to lysis mediated by adherent natural killer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 1996; 43:226-230.
- 36) Botzler C., Kolb H.J., Issels R.D., Multhoff G. Noncytotoxic alkyllysophospholipid treatment increases sensitivity of leukemic K562 cells to lysis by natural killer (NK) cells. *Int. J. Cancer*. 1996; 65:633-638.
- 37) Bova M.P., McHaourab H.S., Han Y., Fung B.K. Subunit exchange of small heat shock proteins. Analysis of oligomer formation of α -crystallin and Hsp27 by fluorescence resonance energy transfer and site-directed truncations. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:1035-1042.
- 38) Boyman O., Conrad C., Dudli C., Kielhorn E., Nickoloff N.J., Nestle F.O. Activation of dendritic antigen-presenting cells expressing common heat shock protein receptor CD91 during induction of psoriasis. *British J. Derm.* 2005; 152:1211-1218.

- 39) Brophy C.M., Lamb S., Graham A. The small heat shock-related protein-20 is an actin-associated protein. *J. Vasc. Surg.* 1999; 29:326–333.
- 40) Bruey J. M., Ducasse C., Bonniaud P., Ravagnan L., Susin S.A., Diaz-Latoud C., Gurbuxani S., Arrigo A.P., Kroemer G., Solary E., et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2:645-652.
- 41) Bubendorf L., Kolmer M., Kononen J., et al. Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; 91:1758–1764.
- 42) Buchberger A., Theyssen H., Schroder H., McCarty J.S., Virgallita G., Milkereit P., Reinstein J., Bukau B. Nucleotide-induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:16903-16910.
- 43) Bulut Y., et al. Chamydial heat-shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependant pathway. *J. Immunol.* 2002; 168:1435-1440.
- 44) Charette S.J., Lavoie J.N., Lambert H., Landry J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20:7602-7612.
- 45) Chauhan D., Li G., Catley L., Hideshima T., et al. 2-Methoxyestradiol overcomes drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood.* 2002; 100:2187-2194.
- 46) Chauhan D., Li G., Hideshima T., Podar K., Mitsiades C., Mitsiades N., Catley L., Tai Y.T., Hayashi T., Shringarpure R., et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood.* 2003; 102:3379-3386.
- 47) Chauhan D., Li G., Hideshima T., Podar K., Mitsiades N., Chen L.B., Munshi N., Saxena S., Anderson K.C. 2-Methoxyestardiol and bortezomib/proteasome-inhibitor overcome dexamethasone-resistance

- in multiple myeloma cells by modulating Heat Shock Protein-27. *Apoptosis*. 2004; 9:149:155.
- 48) Chelouche-Lev D., Kluger H.M., Berger A.J., Rimm D.L., Price J.E. Alpha B-crystallin as a marker of lymph node involvement of breast carcinoma. *Cancer*. 2004; 100:2543-2548.
 - 49) Chen G., Cao P., Goeddel D.V. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol. Cell*. 2002; 9:401-410.
 - 50) Chen L., Lu W., Agarwal S., Zhou W., Zhang R., Chen J. Ubiquitous induction of p53 in tumors by antisense inhibition of MDM2 expression. *Mol. Med*. 1999; 5:21-34.
 - 51) Chen X., Tao Q., Yu H., Zhang L., Cao X. Tumor cell membrane-bound heat shock protein 70 elicits antitumor immunity. *Immunol. Lett*. 2002; 84:81.
 - 52) Ciocca D.R., Calderwood S.K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chap*. 2005; 10(2):86–103.
 - 53) Ciocca D.R., Clark G.M., Tandon A.K., Fuqua S.A.W., Welch W.J., McGuire W.L. Heat shock protein Hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J. Natl. Cancer Inst*. 1993; 85:570–574.
 - 54) Ciocca D.R., Rozados V.R., Cuello-Carrión F.D., Gervasoni S.I., Matar P., Scharovsky O.G. Heat shock proteins 25 and 70 in rodent tumors treated with doxorubicin and lovastatin. *Cell Stress Chap*. 2003; 8:26–36.
 - 55) Clos J., Westwood J.T., Becker P.B., Wilson S., Lambert K., Wu C. Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. *Cell*. 1990; 63:1085–1097.
 - 56) Concannon C.G., Gorman A.M., Samali A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*. 2003; 8:61-70.

- 57) Connell P., Ballinger C.A., Jiang J., Wu Y., Thompson L.J., Hoehfeld J., Patterson C. Regulation of heat shock protein-mediated protein triage decisions by the co-chaperone Chip. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3:93–96.
- 58) Cuesta R., Laroia G., Scheneider R.J. Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev.* 2000; 14:1460-1470.
- 59) Dai Q., Zhang C., Wu Y., et al. Chip activates Hsf1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *EMBO J.* 2003; 22:5446–5458.
- 60) De Jong W.W., Caspers G.-J., Leunissen J.A.M. Genealogy of the α -crystallin: small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.* 1998; 22:151–162.
- 61) De Leo A.B., Srivastava P.K. Cell surface antigens of chemically induced sarcomas of murine origin. *Cancer Surv.* 1985; 4:21-34.
- 62) Delneste Y., Magistrelli G., Gauchat J., Haeuw J., Aubry J., Nakamura K., Kawakami-Honda N., Goetsch L., Sawamura T., Bonnefoy J., Jeannin P. Involvement of LOX-1 in Dendritic Cell-mediated Antigen Cross-presentation. *Immunity.* 2002; 17:353-362.
- 63) Derham B., Harding J. α -Crystallin as a molecular chaperone. *Prog. Retinal Eye Res.* 1999; 18:463–509.
- 64) Dermine J.F., Duclos S., Garin J., et al. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:18507-18512.
- 65) Di Paolo N., Tuve S., Ni S., Hellström K.E., Hellström I., Lieber A. Effect of adenovirus-mediated heat shock protein expression and oncolysis in combination with low-dose cyclophosphamide treatment on antitumor immune responses. *Cancer Res.* 2006; 66(2):960-969.
- 66) Doody A.D., Kovalchin J.T., Mihalyo M.A. et al. Glycoprotein 96 can Chaperone both MCH class I and Class II restricted epitopes for in vivo

- presentation but selectively primes CD8⁺ T cell effector function. *J. Immunol.* 2004; 172(10):6087-6092.
- 67) Dressel R., Elsner L., Quentin T., Walter L., Gunther E. Heat shock protein 70 is able to prevent heat shock-induced resistance of target cells to CTL. *J. Immunol.* 2000; 164:2362-2371.
 - 68) Ehrenfried J.A., Herron B.E., Townsend C.M. Jr., Evers B.M. Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers. *Surg. Onc.* 1995; 4:197-203.
 - 69) Ehrnsperger et al. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 1997; 16:221-229.
 - 70) Erdo F., Erdo S.L. Bimoclolmol protects against vascular consequences of experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res. Bull.* 1998; 45:163-166.
 - 71) Feng H., Zeng Y., Graner M.W., Likhacheva A., Katsanis E. Exogenous Stress Proteins Enhance the Immunogenicity of Apoptotic Tumor Cells and Stimulate Antitumor Immunity. *Blood.* 2003; 101:245-252.
 - 72) Flaherty K.M., DeLuca-Flaherty C., McKay D.B. Three dimensional structure of the ATPase fragment of a 70k heat-shock cognate protein. *Nature.* 1990; 346:623-628.
 - 73) Foster B.A., Coffey H.A., Morin M.J., Rastinejad F. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science.* 1999; 286:2507-2510.
 - 74) Fourie, A.M., Peterson, P.A., Yang, Y. Characterization and regulation of the major histocompatibility complex-encoded proteins Hsp70-Hom and Hsp70-1/2. *Cell Stress Chap.* 2001; 6:282-295.
 - 75) Freeman B.C., Myers M.P., Schumacher R., Morimoto R.I. Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity substrate binding interaction with HDJ-1. *EMBO J.* 1995; 14:2281-2292.

- 76) Freeman B.C., Yamamoto K.R. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science*. 2002; 296:2232–2235.
- 77) Frydman J., Hohfeld J. Chaperones get in touch, the Hip-Hop connection. *Trends Biochem. Sci.* 1997; 22:87-92.
- 78) Fuchs S.Y., Adler V., Buschmann T., Yin Z., Wu X., Jones S.N., Ronai Z. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in non-stressed cells. *Genes Dev.* 1998;12:2658-2663.
- 79) Gabai V.L., Mabuchi K., Mosser D.D., Sherman M.Y. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 2002; 22:3415-3424.
- 80) Garrido C., Bruey J.M., Fromentin A., Hammann A., Arrigo A.P., Solary E. Hsp27 Inhibits cytochrome c dependent activation of procaspase-9. *FASEB J.* 1999; 13:2061-2070.
- 81) Geng H., Zhang G.M., Xiao H., Yuan Y., Li D., Zhang H., Qiu H., He Y.F., Feng Z.H. Hsp70 vaccine in combination with gene therapy with plasmid DNA encoding sPD-1 overcomes immune resistance and suppresses the progression of pulmonary metastatic melanoma. *Int. J. Cancer.* 2006; 118(11):2657-2664.
- 82) Georgopoulos C., Welch W.J. Role of the major Heat Shock Proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1993; 9:601-634.
- 83) Giese K.C., Vierling E. Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:46310–46318.
- 84) Giese, K.C., Vierling, E. Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:46310–46318.
- 85) Gotoh T., Terada K., Oyadomari S., Mori M. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Diff.* 2004; 11:90-402.

- 86) Green M., Schuetz T.J., Sullivan E.K., Kingston R.E. A heat-shock-responsive domain of human Hsf1 that regulates transcription activation domain function. *Mol. Cell Biol.* 1995; 15:3354–3362.
- 87) Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999; 13:1899-1911.
- 88) Gross C., Hansch D., Gastpar R., Multhoff G. Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94. *Biol. Chem.* 2003; 384(2):267-279.
- 89) Gross L. Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res.* .1943; 3:326-333
- 90) Guay J., Lambert H., Gingras-Breton G., Lavoie J.N., Hout J., Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 MAP kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Cell Sci.* 1997; 110:357-368.
- 91) Guo Y., Guettouche T., Fenna M., Boellmann F., Pratt W.B., Toft D.O., Smith D.F., Voellmy R. Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J. Biol Chem.* 2001; 276:45791–45799.
- 92) Habich C., et al. The receptor for heat-shock protein 60 on macrophages is saturable, specific and distinct of receptors for Small heat-shock protein structures reveal a continuum from symmetric to variable assemblies.other heat shock proteins. *J. Immunol.* 2002; 168:569-576.
- 93) Haley D.A., Bova M.P., Huang Q.-L., Mchaourab H.S., Stewart P.L. *J. Mol. Biol.* 2000; 298(2):261-272.
- 94) Haley D.A., Horwitz J., Stewart P.L. The small heat-shock protein, alphaB-crystallin, has a variable quaternary structure. *J. Mol. Biol.* 1998; 277:27–35.
- 95) Hartl F.U. Molecular chaperones in cellular protein holding. *Nature.* 1996; 381:571-579.

- 96) Haslbeck M., Buchner J. Chaperone function of sHsps. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 2002; 28:37–59.
- 97) Haslbeck M., et al. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* 1999; 18:6744–6751.
- 98) Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurter D., Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature Struc. Mol. Biol.* 2005, 12:842-6.
- 99) Hauser H., Shen L., Gu Q.L., Krueger S., Chen S.Y. Secretory heat-shock protein as a dendritic cell-targeting molecule: a new strategy to enhance the potency of genetic vaccines. *Gene Ther.* 2004; 11:924-32.
- 100) Head M., Corbin E., Goldman J. Coordinate and independent regulation of α B-crystallin and HSP27 expression in response to physiological stress. *J. Cell Physiol.* 1994; 159:41–50.
- 101) Hedge R.S., Zuo J., Voellmy R., Welch W.J. Short circuiting stress protein expression via a tyrosine kinase inhibitor, herbimycin A. *J. Cell Physiol.* 1995; 165:186–200.
- 102) Heufelder A.E., Wenzel B.E., Bahn R.S. Cell surface localization of a 72 kilodalton heat shock protein in retroocular fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy. *J. Clin. Endoc. Met.* 1992; 74:732-736.
- 103) Hightower L.E. Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J. Cell Physiol.* 1980; 102:407–427.
- 104) Hightower L.E., Guidon P.T. Selected release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J. Cell Physiol.* 1989; 138:257-266.
- 105) Hino M., Kurogi K., Okubo M.A., Murata-Hori M., Hosoya H. Small heat shock protein 27 (Hsp27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 271:164-169.
- 106) Holmberg C.I., Hietakangas V., Mikhailov A., et al. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* 2001; 20:3800–3810.

- 107) Holmberg C.I., Tran S.E.F., Eriksson J.E., Sistonen L. Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* 2002; 27:619–627.
- 108) Horman S., Fokan D., Mosselmans R., Mairesse N., Galand P. Anti-sense inhibition of small-heat-shock-protein (HSP27) expression in MCF-7 mammary-carcinoma cells induces their spontaneous acquisition of a secretory phenotype. *Int. J. Cancer.* 1999; 82:574–582.
- 109) Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89:10449–10453.
- 110) Horwitz J. Alpha-crystallin. *Exp. Eye Res.* 2003; 76:145–153.
- 111) Houghton A.N., Gold J.S., Blachere N.E. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr. Opin. Immunol.* 2001; 13:134.
- 112) Hout J., Lambert H., Lavoie J.M., Guimond A., Houle F., Landry J. Characterization of 45-kDa/54-kDa Hsp27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat shock protein Hsp27. *Eur. J. Biochem.* 1995; 227:416–427.
- 113) Hsu P.L., Hsu S.M. Abundance of heat shock proteins (Hsp89, Hsp60, and Hsp27) in malignant cells of Hodgkin's disease. *Cancer Res.* 1998; 58:5507–5513.
- 114) Hsu A.L., Murphy C.T., Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science.* 2003; 300:1142–1145.
- 115) Huot J., Houle F., Spitz D.R., Landry J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 1996; 56:273–279.
- 116) Hupp T.R., Sparks A., Lane D.P. Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell.* 1995; 83:237–245.

- 117) Ingola T.D., Craig E.A. Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1982; 79:2360-2364.
- 118) Inouye S., Katsuki K., Izu H., et al. Activation of heat shock genes is not necessary for protection by heat shock transcription factor I against cell death due to a single exposure to high temperatures. *Mol. Cell Biol.* 2003; 23:5882–5895.
- 119) Ito H., Okamoto K., Kato K. Enhancement of expression of stress proteins by agents that lower the levels of glutathione in cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1998; 1397:223-230.
- 120) Iwaki A., Nagano T., Nakagawa M., Iwaki T., Fukumaki Y. Identification and characterization of the gene encoding a new member of the alpha-crystallin/small hsp family, closely linked to the alphaB-crystallin gene in a head-to-head manner. *Genomics.* 1997; 45:386-394.
- 121) Jaattela M., Wissing D., Kokholm K., Kallunki T., Egeblad, M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* 1998; 17:6124-6134.
- 122) Jacob U., Gaestel M., Engel K., Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:1517-1520.
- 123) Joannisse D.R., Inaguma Y., Tanguay R.M. Cloning and developmental expression of a nuclear ubiquitin-conjugating enzyme (DmUbc9) that interacts with small heat shock proteins in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 244:102-109.
- 124) Jones E.L., Zhao M.J., Stevenson M.A., Calderwood S.K. The 70 kilodalton heat shock protein is an inhibitor of apoptosis in cancer. *Int. J. Hyperthermia.* 2004; 20:835-849.
- 125) Kakisuka A. Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends Genet.* 1998; 14:396-402.
- 126) Kamal A., Thao L., Sensintaffar J., Zhang L., Boehm M.F., Fritz L.C., Burrows F.J. A high affinity conformation of Hsp90 confers tumor selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature.* 2003; 425:407-410.

- 127) Kamradt M.C., Chen F., Cryns V.L. The small heat shock protein B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:16059-16063.
- 128) Kappe G., Verschuure P., Philipsen R.L., et al. Characterization of two novel human small heat shock proteins: Protein kinase-related HspB8 and testis-specific HspB9. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001; 1520:1-6.
- 129) Kato K., Goto S., Inaguma Y., Hasegawa K., Morishita R., Asano T. Purification and characterization of a 20-kDa protein that is highly homologous to alpha B crystallin. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:15302-15309.
- 130) Katoh M., Koninkx J., Schumacher U. Heat shock protein expression in human tumours grown in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Lett.* 2000; 161:113-120.
- 131) Kim H.R., Kang H.S., Kim H.D. Geldanamycin induces heat shock protein expression through activation of HSF1 in K562 erythroleukemic cells. *IUBMB Life.* 1999; 48:429-433.
- 132) Kim K.K., Kim R., Kim S.H. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature.* 1998; 394:595-599.
- 133) Klemenz R., Frohli E., Steiger R.H., Schafer R., Aoyama A. Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88:3652-3656.
- 134) Knauf U., Newton E.M., Kyriakis J., Kingston R.E. Repression of human heat shock factor activity at control temperature by phosphorylation. *Genes Dev.* 1996; 10:2782-2793.
- 135) Knowlton A.A., Sun L. Heat shock factor-1, steroid hormones, and the regulation of heat-shock protein expression in the heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ.* 2001; 280:455-464.
- 136) Kol A. et al. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J. Clin. Invest.* 1999; 103:571-577.

- 137) Kol A. et al. Cutting edge: Heat-shock protein (Hsp) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for Hsp60 activation of mononuclear cells. *J. Immunol.* 2000; 164:13-17.
- 138) Koteiche H.A., Mchaourab H.S. Mechanism of chaperone function in small heat-shock proteins. Phosphorylation-induced activation of two-mode binding in alpha B-crystallin. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:10361–10367.
- 139) Krief S., Faivre J.F., Robert P., et al. Identification and characterization of cvHsp. A novel human stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues. *J. Biol. Chem.* 1999; 10:103-126.
- 140) Landry J., Hout J. Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by signaling pathway involving MAP kinase and heat shock protein 27. *Biochem. Cell Biol.* 1995; 73:703-707.
- 141) Langdon S.P., Rabiasz G.J., Hirst G.L., et al. Expression of the Heat shock protein Hsp27 in human ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 1995; 1:1603-1609.
- 142) Lathangue N.B., Latchman D.S. A cellular protein related to heat shock protein 90 accumulates during herpes-simplex-virus infection and is overexpressed in transformed cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 178:169-179.
- 143) Lavoie J.N., Hickey E., Weber L.A., Landry J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:24210-24214.
- 144) Lee G.J., Roseman A.M., Saibil H.R., Vierling E. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* 1997; 16:659–671.
- 145) Lee J.S., Marcu M.G., Neckers L. Quantum chemical calculations and mutational analysis suggest that heat shock protein 90 catalyzes trans-cis isomerization of geldanamycin. *Chem. Biol.* 2004; 11: 991-998.
- 146) Lehmann T.A., Bennet W.P., Metcalf R.A. P53 mutations, ras mutations and p53-heat shock protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1991; 51:4090–4096.

- 147) Lentze N., Aquilina J.A., Lindbauer M., Robinson C.V., Narberhaus F. Temperature and concentration-controlled dynamics of rhizobial small heat shock proteins. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271:2494–2503.
- 148) Li D., Li H., Zhang P., Wu X., Wei H., Wang L., Wan M., Deng P., Zhang Y., Wang J., Liu Y., Yu Y., Wang L. Heat Shock fusion protein induces both specific and nonspecific anti-tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36:1324-1336.
- 149) Li G.C., Li L., Liu R.V., Rechman M., Lee W.M. Heat Shock protein hsp70 protects cells from thermal stress even after deletion of its ATP-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89:2036-2041.
- 150) Li Z., Qiao Y., Liu B., Laska E.J., Chakravarthi P., Kulko J.M., Bona R.D., et al. Combination of imatinib mesylate with autologous leukocyte-derived heat shock protein and chronic myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11:4460-4468.
- 151) Liang P., MacRae T.H. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 1997; 110:1431–1440.
- 152) Lindquist S., Craig E.A. The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genetics.* 1988; 22:631-677.
- 153) Lipsker D., et al. Heat shock proteins 60 and 70 share common receptors which are expressed on human monocyte-derived but not epidermal dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2002; 82:322-332.
- 154) Liu C., Gilmont R.R., Benndorf R., Welsh M.J. Identification and Characterization of a Novel Protein from Sertoli Cells PASS1 that Associates with Mammalian Small Stress Protein Hsp27. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:18724-18731.
- 155) Liu P.C.C., Thiele D.J. Modulation of human heat shock factor trimerization by the linker domain. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:17219–17225.
- 156) Liu Q.L., Kishi H., Ohtsuka K., Muraguchi A. heat shock protein 70 binds caspase activated DNase and enhances its activity in TCR-stimulated T cells. *Blood.* 2003; 102:1788-1796.

- 157) Lodish H., Berk A., Ziprusky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. *Molecular and Cell Biology*. Editorial Freeman, Cuarta Edición. E.U.A. 2000. pp. 752-843.
- 158) Love S., King R.J. A 27kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. *Br. J. Cancer*. 1994; 69:743-748.
- 159) Lubbers N.L., Polakowski J.S., Wegner C.D., Burke S.E., Diaz G.J., Daniell K., Cox B.F. Oral bimosamol elevates heat shock protein 70 and reduces myocardial infarct size in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 435:79-83.
- 160) Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998; 94:481-490.
- 161) Madara J., Krewet J., Shah M. Heat shock protein 70 expression allows permissive replication of oncolytic adenovirus dII520 (ONYX-015) in rat glioblastoma cells. *Mol. Cancer*. 2005; 4(2):1-10.
- 162) Mairesse N., Horman S., Mosselmans R., Galand P. Antisense inhibition of the 27 kDa heat shock protein production affects growth rate and cytoskeletal organization in MCF-7 cells. *Cell Biol. Int.* 1996; 20:205-212.
- 163) Mao H., Li F., Ruchalski K., Mosser D. D., Schwartz J. H., Wang Y., Borkan S. C. Hsp72 inhibits focal adhesion kinase degradation in ATP-depleted renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:18214-18220.
- 164) Massa C., Guiducci C., Arioli I., Parenza M., Colombo M.P., Melani C. Enhanced efficacy of tumor cell vaccines transfected with secretable hsp70. *Cancer Res.* 2004; 64:1502-1508.
- 165) Massa C., Melani C., Colombo M.P. Chaperon and adjuvant activity of hsp70: different natural killer requirement for cross-priming of chaperoned and bystander antigens. *Cancer Res.* 2005; 65(17):7942-7949.

- 166) McMillan D.R., Xiao X., Shao L., Graves K., Benjamin I.J. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:7523–7528.
- 167) Mehlen P., Kretz-Remy C., Preville X., Arrigo A.P. Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J. Immunol.* 1995; 154:363-374.
- 168) Mehlen P., Preville X., Chareyron P., Biolay J., Klemenz R., Arrigo A.P. Human hsp27, *Drosophila* hsp27, and human alpha B-crystallin expression mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *EMBO J.* 1996; 15:2695-2706.
- 169) Mendez F., Sandigursky M., Kureekattil R.P., Kenny M.K., Franklin W.A., Bases R. Specific stimulation of human apurinic/aprimidinic endonuclease by heat shock protein 70. *DNA Repair.* 2003; 2:259–271.
- 170) Menoret A., Chandawarkar R.Y., Srivastava P.K. Natural antibodies against heat shock proteins HSP70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins. *J. Immunol.* 2000; 101(3):364-370.
- 171) Meriin A.B., Yaglom J.A., Gabai V.L., Zon L., Ganiatsas S., Mosser D.D., Sherman M.Y. Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation, a novel pathway controlled by HSP72. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19:2547-2555.
- 172) Miron T., Vancompernelle K., Vandekerckhove J., Wilchek M., Geiger B. A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J. Cell Biol.* 1991; 114:255–261.
- 173) Misumi Y., Miki K., Takatsuki A., Tamura G., Ikehara Y. Novel blocking by befeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1986; 261:11398-11403.
- 174) Mizzen L.A., Chang C., Garrels J.I., Welch W.J. Identification, characterization and purification of two mammalian stress proteins

present in mitochondria, grp 75, a member of the Hsp70 family and hsp 58, a homolog of the bacterial groEL protein. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:20664-20675.

- 175) Mortaz E., Redegeld F.A., Nijkamp F.P., Wong H.R., Engels F. Acetylsalicylic acid-induced release of Hsp70 from mast cells results in cell activation through TLR pathway. *Exp. Hematology* 2006; 34:8-18.
- 176) Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L., Meriin A. B., Sherman M. Y., Morimoto R. I., Massie, B. The chaperone function of Hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20:7146-7159.
- 177) Moyano J.V., et al. α B-Crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Invest.* 2006; 116:261-270.
- 178) Multhoff G. Activation of natural killer cells by heat shock 70 proteins. *Int. J. Hiperthermia.* 2002; 18(6):676-685.
- 179) Nadeau K., Das A., Walsh C.T. Hsp90 cochaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:1479–1487.
- 180) Nadin S., Vargas-Roig L.M., Cuello-Carrión F.D., Ciocca D.R. Deoxyribonucleic acid damage induced by doxorubicin in peripheral blood mononuclear cells: possible roles for the stress response and the deoxyribonucleic acid repair process. *Cell Stress Chap.* 2003; 8:361–371.
- 181) Nakai A., Morimoto R.I. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol. Cell Biol.* 1993; 13:1983–1997.
- 182) Narberhaus F. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002; 66:64–93.
- 183) Neckers L., Ivy S.P. Heat shock protein 90. *Curr. Opin. Oncol.* 2003; 15:419–424.

- 184) Neckers L., Neckers K. Heat shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutics - an update. *Expert Opin. Emerg. Drugs.* 2005; 10:137-149.
- 185) Netzer W.F., Hartl F.U. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and-independent mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 1998; 23:68-74.
- 186) Oesterreich S., Weng C.N., Qiu M., Hilsenbeck S.G., Osborne C.K., Fuqua S.A. The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1993; 53:4443-4448.
- 187) Ohashi K., et al. Cutting edge: Heat-shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor 4 complex. *J. Immunol.* 2000; 164:558-561.
- 188) Ohtsuka K., Nakamura H., Sato C. Intracellular distribution of 73,000 and 72,000 dalton heat shock proteins in HeLa cells. *Int. J. Hyperthermia.* 1986; 2:267-275.
- 189) Oki Y., Younes A. Heat Shock protein-based cancer vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2004; 3(4):403-411.
- 190) Palleros D.R., Shi L., Reid K.L., Fink A.L. Hsp-70 protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:13107-13114.
- 191) Palleros D.R., Welch W.J., Fink A.L. Interaction of Hsp70 with unfolded proteins, effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88:5719-5723.
- 192) Pandey P., Farber R., Nakazawa A., Kumar S., Bharti A., Nalin C., Weichselbaum R., Kufe D., Kharbanda, S. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene.* 2000; 19:1975-1981.
- 193) Parcellier A., Schmitt E., Gurbuxani S., Seigneurin-Berny D., Pance A., Chantome A., Plenchette S., Khochbin S., Solary E., Garrido C. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-B proteasomal degradation. *Mol. Cell Biol.* 2003; 23:5790-5802.

- 194) Park H.S., Lee J.S., Huh S.H., Seo J.S., Choi E.J. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J.* 2001; 20:446-456.
- 195) Park K.J., Gaynor R.B., Kwak Y.T. Heat shock protein 27 association with the IB kinase complex regulates tumor necrosis factor -induced NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:35273-35278.
- 196) Parsell D.A., Lindquist S. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann. Rev. Genetics.* 1993; 27:437-496.
- 197) Parsellier A., Gurbuxani S., Schmitt E., Solary E., Garrido C. Heat Shock Proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 304:505-512.
- 198) Paul C., Manero F., Gonin S., Kretz-Remy C., Virost S., Arrigo A.P. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome c release. *Mol. Cell Biol.* 2002; 22:816-834.
- 199) Peetermans et al. Murine peritoneal macrophages activated by the mycobacterial 65-kilodalton heat-shock protein express enhanced microbicidal activity in vitro. *Infect. Immun.* 1993; 61:868-875.
- 200) Pelham H.R. Heat shock and the sorting of luminal ER proteins. *EMBO J.* 1989; 8:3171-3176.
- 201) Perng M.D., Cairns L., Van den I.J., Prescott A., Hutchison A.M., Quinlan R.A. Intermediate filament interactions can be altered by Hsp27 and α B-crystallin. *J. Cell. Sci.* 1999; 112:2099-2112.
- 202) Pilla L., Squarcina P., Coppa J., Mazzaferro V., Huber V., Pende D., Maccalli C., et al. Natural killer and NK-like T-cell activation in colorectal carcinoma patients treated with autologous tumor-derived heat shock protein 96. *Cancer Res.* 2005; 65:3942-3949.
- 203) Pinder S.E., Balsitis M., Ellis I.O., Landon M., Mayer R.J., Lowe J. The expression of alpha B-crystallin in epithelial tumors: a useful tumor marker? *J. Pathol.* 1994; 174:209-215.

- 204) Pratt W.B., Toft D.O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 1997; 18:306–360.
- 205) Pratt W.D., Toft D.O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med. Exp.* 2003; 228:111-133.
- 206) Prodromou C., Roe S.M., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H. Identification and structural characterization of the ATP/ADP binding-site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell.* 1997; 90:65-75.
- 207) Prohászka Z., Füst G. Immunological aspects of Heat-shock proteins - the optimum stress of life. *Mol. Immunol.* 2004; 41:29-44.
- 208) Rahman D.R., Bentley N.J., Tuite M.F. The *Saccharomyces cerevisiae* small heat shock protein Hsp26 inhibits actin polymerisation. *Biochem. Soc. Trans.* 1995; S:23:77.
- 209) Raulston J.E., Davis C.H., Scmiel D.H., Morgan M.W., Wyrlik P.B. Molecular characterization and outer membrane association of a *Chlamydia trachomatis* protein related to the Hsp70 family of proteins. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:23139-23147.
- 210) Rehman A., Chahal M.S., Tang X., Bruce J.E., Pommier Y., Daoud S.S. Proteomic identification of heat shock protein 90 as a candidate target for p53 mutation reactivation by PRIMA-1 in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2005; 7:765-774.
- 211) Renkawek K., de Jong W.W., Merck K.B., Frenken C.W., van Workum F.P., Bosman G.J. α B-Crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol.* 1992; 83:324–327.
- 212) Renkawek K., Voorter C.E., Bosman G.J., van Workum F.P., de Jong W.W. Expression of α B-crystallin in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1994; 87:155–160.
- 213) Rohde M., Daugaard M., Jensen M. H., Helin K., Nylandsted J., Jäättelä M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev.* 2005; 19(5):570-582.

- 214) Rosenberg S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*. 2001; 411:380.
- 215) Saleh A., Srinivasula S.M., Balkir L., Robbins P.D., Alnemri E.S. Negative regulation of the apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2:476-483.
- 216) Sato S., Fujita N., Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97:10832-10837.
- 217) Söti C., Subbaro A., Csermely P. Apoptosis, necrosis and cellular senescence: chaperone occupancy as a potential switch. *Aging cell.* 2003; 2:39-45.
- 218) Schmid D., Baici A., Gehring H., Christen P. Kinetics of molecular chaperone action. *Science*. 1994; 263:971-973.
- 219) Schneider G.B., Hamano H., Cooper L.F. In vivo evaluation of hsp27 as an inhibitor of actin polymerization: hsp27 limits actin stress fiber and focal adhesion formation after heat shock. *J. Cell Physiol.* 1998; 177:575–584.
- 220) Schulte T.W., Neckers L.M. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1998; 42:273-279.
- 221) Scott A.M., Welt S. Antibody-based immunological therapies. *Curr. Opin. Immunol.* 1997; 9:717.
- 222) Shin K.D., Lee M.-Y., Shin D.-S., Lee S., Son K.-H., Koh S., Paik Y.-K., Kwon B.-M., Han D.C. Blocking tumor cell migration and Invasion with Biphenyl Isoxazole derivative KRIBB3, a synthetic molecule that inhibits Hsp27 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:41439-41448.
- 223) Sigal L.H., et al. H9724, a monoclonal antibody to *Borrelia burgdorferi*'s flagellin, binds to heat-shock protein 60 (Hsp60) within live neuroblastoma cells: a potential role for Hsp60 in peptide hormone signalling and in an autoimmune pathogenesis of the neuropathy of Lyme disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2001; 21:477-495.

- 224) Sittler A., Lurz R., Lueder G., Priller J., Lehrach H., Hayer-Hartl M.K., Hartl F.U., Wanker E.E. Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10:1307-1315.
- 225) Sobott F., Benesch J.L., Vierling E., Robinson C.V. Subunit exchange of multimeric protein complexes. Real-time monitoring of subunit exchange between small heat shock proteins by using electrospray mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:38921–38929.
- 226) Solit D.B., Basso A.D., Olshen A.B., Scher H.I., Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res.* 2003; 63:2139-2144.
- 227) Spears P.A., Barnes J.A. HSP70 enhances MCF-7 cell growth and estrogen receptor activity. *Proc. 1st Int.. Cong Stress Responses Biol. Med. Québec.* 2003; September 10-14, pp.73.
- 228) Sreedhar A.S., Csermely P. Heat Shock Proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 2004; 101:227-257.
- 229) Srinivasan A.N., Nagineni C.N., Bhat S.P. α A-Crystallin is expressed in non-ocular tissues. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:23337–23341.
- 230) Srivastava P.K., Jaikaria N.S. Methods of purification of heat shock protein-peptide complexes for use as vaccines against cancers and infectious diseases. *Methods Mol. Biol.* 2001; 156:175-186.
- 231) Srivastava P.K., Menoret A., Basu S., Binder R.J., McQuade K.L. Heat Shock Proteins Come of Age: Primitive Functions Acquire New Roles in the Adaptive World. *Immunity.* 1998; 8:657-665.
- 232) Suto R., Srivastava P.K. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science.* 1995; 269(5230):1585-1588.
- 233) Suzue K., Zhou X., Eisen H.N., Young R.A. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the mayor histocompatibility

- complex class I presentation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94:13146-13151.
- 234) Suzuki A., Sugiyama Y., Hayashi Y. MKBP, a novel member of the small heat shock protein family, binds and activates the myotonic dystrophy protein kinase. *J. Cell Biol.* 1998; 140:1113-1124.
- 235) Takahashi S., Mikami T., Watanabe Y., et al. Correlation of heat shock protein 70 expression with estrogen receptor levels in invasive human breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994; 101:519-525.
- 236) Tamura Y., Peng P., Liu K., Daou M., Srivastava P.K. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science.* 1997; 278:117-120.
- 237) Tanabe M., Nakai A., Kawazoe Y., Nagata K. Different thresholds in the responses of two heat shock transcription factors, Hsf1 and Hsf3. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:15389-15395.
- 238) Tanabe M., Sasai N., Nagata K., Liu X.D., Liu P.P.C., Thiele D.J., Nakai A. The mammalian hsf4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:27845-27856.
- 239) Tavaría, M., Gabriele, T., Kola, I., Anderson, R.L. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chap.* 1996; 1:23-28.
- 240) Tournier C., Hess P., Yang D.D., Xu J., Turner T.K., Nimmual A., Bar-Sagi D., Jones S.N., Flavell R.A., Davis, R.J. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science.* 2000; 288:870-874.
- 241) Udono H., Levey D.L., Srivastava P.K. Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: Tumor rejection antigen gp96 primes CD8⁺ T cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91:3077-3081.
- 242) Udono H., Srivastava P.K. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J. Exp. Med.* 1993; 178(4):1391-1396.

- 243) Vabulas R.M., Ahmad-Nejad P., Ghose S., Kirschning C.J., Issels R.D., Wagner H. Hsp70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:15107-15112.
- 244) Vabulas R.M., Braedel S., Hilf N., Singh-Jasuja H., Herter S., Ahmad-Nejad P., Kirschning C.J., Da Costa C., Rammensee H.G, Wagner H., Schild H. The endoplasmic reticulum resident Heat Shock Protein Gp96 activates Dendritic Cells Via Toll-Like receptor 2/4 Pathway. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:20847-20853.
- 245) Van den Eynde B., Van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 1996; 9:684-693.
- 246) Van Montfort R., Slingsby C., Vierling E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv. Protein Chem.* 2001b; 59:105-156.
- 247) Van Montfort R.L., Basha E., Friedrich K.L., Slingsby C., Vierling E. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* 2001a; 8:1025-1030.
- 248) Van Noort J.M. Multiple sclerosis: an altered immune response or an altered stress response? *J.Mol.Med.* 1996;74:285-296.
- 249) Vargas-Roig L.M., Fanelli M.A., López L.A., Gago F.E., Tello O., Aznar J.C., Ciocca D.R. Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples. altered stress response? *J. Mol. Med.* 1996; 74:285-296 *Cancer Detect Prev.* 1997; 21:441-451.
- 250) Vargas-Roig L.M., Gago F.E., Tello O., Aznar J.C., Ciocca D.R. Heat shock expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*. 1998; 79:468-475.
- 251) Vasilevskaya I.A., Rakitina T.V., O'Dwyer P.J. Geldanamycin and its 17-allylamino-17-demethoxy analogue antagonize the action of cisplatin in human colon adenocarcinoma cells: differential caspase activation as a basis for interaction. *Cancer Res.* 2003; 63:3241-3246.

- 252) Vaupel P., Kallinowsky F., Okiuneff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 1989; 49:6449-6465.
- 253) Voellmy R. On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell Stress Chap.* 2004; 9(2):122-133.
- 254) Volloch V.Z., Sherman M.Y. Oncogenic potential of Hsp72. *Oncogene.* 1999; 18:3648-3651.
- 255) Volm M., Rittgen W. Cellular predictive factors for the drug response of lung cancer. *Anticancer Res.* 2000; 20:3449-3458.
- 256) Wang C.Y., Guttridge D.C., Mayo M.W., Baldwin A.S. Jr. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19:5923-5929.
- 257) Wang C.Y., Mayo M.W., Korneluk R.G., Goeddel D.V. Baldwin A.S.J. NF- κ B antiapoptosis, induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 1998; 281:1680-1683.
- 258) Wang R., Kovalchin J.T., Muhlenkamp P., Chandawarkar R.Y. Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MCH-II presentation of antigens. *Blood.* 2006; 107(4):1636-1642.
- 259) Wang T.F., Chang J.H., Wang C. Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:26049-26051.
- 260) Warrick J.M., Chan H.Y., Gray-Board G.L., Chai Y., Paulson H.L., Boninni N.M. Suppression of poliglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone Hsp70. *Nat. Genet.* 1999; 23:425-428.
- 261) Wawrousek E.F., Brady J.P. AlphaB-crystallin Gene Knockout Mice Develop a Severe Fatal Phenotype Late in Life. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998; 39:S523.

- 262) Weinberg R.A. How cancer arises. *Sci. America*. 1996; 275(3):62.
- 263) Weiss R.A., Madaio M.P., Tomaszewski J.E., Kelly J.C. T cells reactive to an inducible heat shock protein induce disease in toxin-induced interstitial nephritis. *J. Exp. Med.* 1994; 180:2239-2250.
- 264) Welsh M.J., Gaestel M. Small heat-shock protein family: function in health and disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998; 851:28-35.
- 265) Westerheide S.D., Morimoto R.I. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:33097-33100.
- 266) Whitesell L., Mimnaugh E.G., De Costa B., Meyers C.E., Neckers L.M. Inhibition of Heat shock protein Hsp90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91:8324-8328.
- 267) Wisniewski J., Orosz A., Allada R., Wu C. The C-terminal region of *Drosophila* heat shock factor (Hsf) contains a constitutively functional transactivation domain. *Nucl. Acids Res.* 1996; 24:367-374.
- 268) Workman, P. Pharmacogenomics in cancer drug discovery and development: inhibitors of the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Detect Prev.* 2002; 26:405-410.
- 269) Wulfkuhle J.D., et al. Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. *Cancer Res.* 2002; 62:6740-6749.
- 270) Yamamoto K., Ichijo H., Korsmeyer S.J. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19:8469-8478.
- 271) Yamazaki K., Nguyen T., Podack E.R. Cutting edge: tumor secreted heat shock-fusion proteins elicits CD8 cells for rejection. *J. Immunol.* 1999; 163:5178-5182.
- 272) Yoshino I., Goedegebuure P.S., Peoples G.E., Lee K.Y., Eberlein T.J. Human tumor infiltrating CD4+ T cells react to B cell lines expressing heat shock protein 70. *J. Immunol.* 1994; 153:4149-4158.

- 273) Zaarur N., Gabai V.L., Porco J.A., Calderwood S., Sherman M.Y. Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and hsp90 inhibitors. *Cancer Res.* 2006; 66(3):1783-1791.
- 274) Zhang Y., Huang L., Zhang J., Moskophidis D., Mivechi N.F. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J. Cell Biochem.* 2002; 86:376-393.
- 275) Zhao C., Hashiguchi K., Kondoh W., Du W., Hata J., Yamada T. Exogenous expression of heat shock protein 90 kDa retards the cell cycle and impairs the heat shock response. *Exp. Cell Res.* 2002; 275:200-214.
- 276) Zheng H., Dai J., Stoilova D., Li Z. Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *J. Immunol.* 2001; 167:6731-6735.
- 277) Zhong M., Orosz A., Wu C. Direct sensing of heat and oxidation by *Drosophila* heat shock transcription factor. *Mol. Cell.* 1998; 2:101-108.
- 278) Zuo J., Baler R., Dahl G., Voellmy R. Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. *Mol. Cell Biol.* 1994; 14:7557-7568.
- 279) Zuo J., Rungger D., Voellmy R. Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol. Cell Biol.* 1995; 15:4319-4330.

Apéndices

a) Abreviaturas

17AAG	17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina
2Me2	2-metoxiestradiol
3LL	Línea celular carcinoma de pulmón: Lewis Lung Carcinoma
ADCC	Citólisis dirigida por anticuerpos
APC	Células presentadoras de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
CAD	DNAasa activada por caspasas
CML	Linfólisis mediada por células
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DC	Células dendríticas
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
gp96	Glucoproteína de peso molecular 96, perteneciente a las Hsp
HSE	Elemento de unión a la proteína del factor de choque térmico
Hsf	Factor de choque térmico
HSF	Proteína del factor de choque térmico
Hsp	Proteínas de choque térmico
HSR	Respuesta al choque térmico
LPS	Lipopolisacárido

LR	Balsas lipídicas
MG132	Inhibidor del proteasoma
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MM	Mieloma múltiple
MUC1	Antígeno de mucina asociado al tumor
PS-341	Inhibidor del proteasoma
sHsp	Proteínas de choque térmico pequeñas
TATA	Antígenos de transplante asociados al tumor
TCR	Receptor de los linfocitos T
TLR	Receptor de la familia Toll-like
TSTA	Antígenos de transplante específicos del tumor

b) Glosario

Adenocarcinoma	Neoplasia perteneciente a un grupo de tumores epiteliales malignos que tienen su localización en glándulas.
Adriamicina	Agente terapéutico de la familia de las antraciclinas que tiene un efecto antitumor muy significativo sobre leucemias, linfomas y tumores sólidos, tales como el cáncer de mama y sarcomas de partes blandas.
Alzheimer	Enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta como deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza en su forma típica por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales, a medida que las neuronas mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian.
Anergia Clonal	Ausencia de reacción de los clones de linfocitos B o T a un antígeno por ausencia de señales adicionales (co-estimuladoras) necesarias para su activación funcional.
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor. Proteína que inicia la apoptosis después de unirse al citocromo C y dATP, para formar el complejo del apoptosoma. Este complejo libera a la caspasa 9, lo cual inicia la apoptosis.
Astrocitoma	Tumor primario del cerebro compuesto por astrocitos y caracterizado por un crecimiento lento con formación de quistes, invasión de las estructuras secundantes y con frecuencia, desarrollo de un glioblastoma de elevada malignidad dentro de la masa tumoral.
Ataxia	Trastorno caracterizado por disminución de la capacidad de coordinar movimientos debido a lesiones en la médula espinal o cerebelo que pueden ser secuelas de infecciones o neoplasias.

Autólogo	Proveniente del mismo organismo.
Balsas Lipídicas	Son fragmentos o secciones de la capa lipídica de la membrana en las cuales prevalecen cadenas de ácidos grasos saturados, las cuales favorecen el empaquetamiento apretado de dichas fracciones (las cuales parecieran flotar entre el resto de la membrana fluida, de ahí el nombre de balsas). Estos fragmentos están compuestos de esfingolípidos y colesterol que usualmente se encuentran en la porción intracelular de la membrana. Se ha observado que estos fragmentos son insolubles en detergentes como el tritón.
B7-H1	Miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Molécula expresada en macrófagos que regula la activación y diferenciación de los linfocitos T.
Bcl-2	B-cell lymphoma 2. Proteína integral de la membrana exterior de la mitocondria que bloquea la apoptosis en algunas células, como los linfocitos B. Su expresión constitutiva parece ser la causa de cáncer, como el linfoma folicular.
Carcinoma celular transicional	Cáncer de vejiga.
CD40	Receptor presente en linfocitos B, macrófagos, células dendríticas y células endoteliales que se une a CD154 e interviene en la activación de linfocitos B dependientes de células T, macrófagos, células dendríticas y células endoteliales.
CD83	Receptor de la super-familia de las Ig que está presente en células dendríticas, células de Langerhans y linfocitos B de los centros germinales, cuya función es desconocida.

CD86	Receptor de la super-familia de las Ig que está presente en linfocitos B, células dendríticas, y algunos linfocitos T, cuya función es co-estimuladora en la activación de linfocitos T. Además es ligando de CD28 y CTLA-4.
CD91	Receptor presente en células descendientes del linaje monocítico, hepatocitos, queratinocitos y fibroblastos, que se une a complejos formados por la proteína plasmática alfa2-microglobulina y provoca la endocitosis de los mismos. Se ha propuesto que el rol de CD91 es el de librar al plasma de sustancias de desecho, debido a que es capaz de unirse al complejo de activación e inactivación del plasminógeno y al complejo urocinasa PAII.
Celastrol	Fármaco antiinflamatorio y antioxidante que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias, e induce a la enzima óxido nítrico sintasa y la peroxidación de lípidos.
Célula Fusiforme	Un tipo de neurona encontrada en la corteza cerebral, caracterizada por su forma alargada en los extremos que recuerdan la forma de huso.
Células de Reed-Sternberg	Célula retículoendotelial anormal, de gran tamaño, que presenta un núcleo múltiple y es característica de la enfermedad de Hodgkin. El número y proporción de este tipo de células son la base de la clasificación histopatológica de dicha enfermedad.
Choque térmico	Procedimiento por medio del cual las células se exponen a 45°C por lapsos de cinco a 10 minutos para favorecer la inducción de proteínas de choque térmico (Hsp).
Citocalasina D	Fármaco que altera el citoesqueleto.

Creutzfeld-Jacob	Trastorno que involucra una disminución rápida de la función mental y el movimiento. Se cree que la causa de estas anomalías es un daño hecho al cerebro por priones.
Dexametasona	Fármaco corticosteroide antiinflamatorio utilizado en el tratamiento de los síntomas producidos por un brusco descenso de los niveles de corticoides en el organismo, por ejemplo en la enfermedad de Addison. También es utilizado en el tratamiento del cáncer.
Doxorubicina	Antibiótico de la familia de las antraciclinas, constituye uno de los agentes antitumorales más importantes. Su mecanismo de acción la interacción con el hierro contenido en el interior de las células, lo que genera radicales libres que se intercalan en el DNA e inhiben su síntesis y la de RNA.
Enfermedad de Chediak-Higashi	Trastorno hereditario del sistema inmunológico que causa infección crónica, disminución de la pigmentación en la piel y en los ojos, enfermedad neurológica y muerte prematura.
Enfermedad de Hodgkin	Trastorno maligno caracterizado por adenopatías no dolorosas en los ganglios cervicales, esplenomegalia y células de Reed-Sternberg.
Esclerosis Lateral Amiotrófica	Amyotrophic lateral sclerosis. Enfermedad neurodegenerativa de las neuronas motoras caracterizada por atrofia de los músculos que inicia en las extremidades y se prolonga hasta afectar la mayor parte del cuerpo.
Esclerosis Múltiple	Enfermedad autoinmune que afecta al sistema nervioso central. Se desconoce la causa exacta, pero se cree que se deriva de un daño a la vaina de mielina, material protector que rodea a las células nerviosas.

FACS	Clasificación celular activada por fluorescencia. Es una técnica que emplea la expresión de varias proteínas de membrana para analizar células. Usualmente se utiliza en conjunto con la citometría de flujo, por medio de la cual se separan las células de acuerdo a una etiqueta fluorescente con la que se incuban.
Granzima B	Enzima serina proteasa que se encuentra en los gránulos de los linfocitos T y células NK que se libera por exocitosis y penetra en las células diana a través de agujeros creados por las perforinas. Esta enzima escinde proteolíticamente a las caspasas, las cuales a su vez inducen la apoptosis de las células diana.
Leucemia mielógena crónica	Transtorno mieloproliferativo que se caracteriza por la presencia del cromosoma filadelfia en las células del sistema inmune.
Lewis Lung Carcinoma	Modelo celular de metástasis y angiogénesis, aislado por primera vez de carcinoma epidermal de pulmón de ratón.
LOX1	Lectin-like oxidized LDL receptor-1. Receptor de la membrana celular que es responsable de la endocitosis de lipoproteínas de baja densidad que se encuentran oxidadas.
MD2	Molécula asociada a TLR4 requerida en la señalización ocasionada por LPS.
Metaplasma escamoso	Transformación o reemplazo de un tejido adulto en otro de la misma clase a partir de una célula indiferenciada o poco diferenciada, capaz de multiplicarse. A partir de ella se generan células con diferente diferenciación.

Mieloma múltiple	Cáncer caracterizado por crecimiento exagerado y disfunción de las células plasmáticas de la médula ósea. El crecimiento de estas células plasmáticas interfiere con la producción de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, lo cual causa anemia, susceptibilidad a infecciones y aumento de la tendencia al sangrado.
MyD88	Proteína adaptadora derivada del mielóide, es un integrante fundamental en la decisión intracelular de desviar la activación de TLR2 hacia la ruta de muerte apoptótica. Se ha demostrado que MyD88 se localiza en el citoplasma de células apoptóticas.
Neuroblastoma	Tumor maligno constituido por ectodermo derivado de la placa neural embrionaria. Puede originarse en cualquier parte del sistema nervioso simpático pero se da principalmente en la médula adrenal de niños pequeños. Metastatiza de forma rápida afectando ganglios linfáticos, hígado, pulmones y hueso.
Oligonucleótidos antisentido	Cadena corta de nucleótidos que se unen al RNA mensajero y bloquean la expresión del gen contenido en el RNA.
Parkinson	Transtorno neurológico degenerativo lentamente progresivo que se caracteriza por temblor en reposo, ausencia de expresión facial, rigidez y debilidad muscular, entre otros. Por lo general es resultado de encefalitis aguda o intoxicación con dióxido de carbono.

P-glicoproteína	Transportador de membrana ligado al gen de resistencia múltiple (MDR1), expresado en células tumorales y en tejidos como intestino, hígado, riñón, médula espinal, barrera hematocefálica y placentaria. Esta proteína limita el acceso de drogas al cerebro, interfiriendo en su farmacocinética. Es por ello que se cree que es un mecanismo de defensa en contra de sustancias que dañan el cerebro.
Presentación cruzada de antígenos	Se refiere a una vía alterna de presentación de antígenos exógenos en donde la rotura de la integridad de la membrana del un fagosoma trae como consecuencia que las proteínas parcialmente fraccionadas escapen al citosol y sean degradadas y montadas en la proteína TAP, componente la cascada de formación del MHC clase I.
Psoriasis	Desorden inflamatorio crónico mediado por linfocitos T en la piel. Enfermedad cutánea común y crónica caracterizada por piel enrojecida, inflamada y cubierta por escamas de color plateado. Las lesiones o placas psoriáticas se pueden presentar en cualquier parte de la piel, pero son más comunes en brazos, piernas, tronco, cabeza y especialmente en codos y rodillas.
Sarcoma de Kaposi	Neoplasia maligna y multifocal de células reticuloendoteliales que comienza como pústulas en la piel y que posteriormente forma metástasis en los ganglios linfáticos y vísceras.
SEK	Cinasa que posee actividad similar a MAPKK. SEK-1 puede activar a JNK-1 en la cascada de señalización de Hog en levaduras.
Valcade	Fármaco antineoplásico utilizado en el tratamiento del mieloma múltiple.