



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

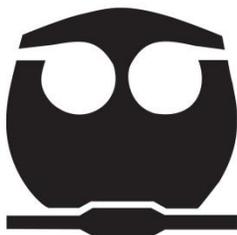
HSP70 PUEDE SER LIGANDO DE TLR-2 Y TLR-4 Y EJERCE
UNA REGULACIÓN NEGATIVA DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA A EXPENSAS DE TNF- α

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGO

PRESENTA

ALDAIR SÁNCHEZ ANAYA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: **PROFESOR: CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS**

VOCAL: **PROFESOR: ENRIQUE ORTEGA SOTO**

SECRETARIO: **PROFESOR: EDUARDO ANTONIO FERAT OSORIO**

1ER. SUPLENTE **PROFESOR: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

2DO. SUPLENTE **PROFESOR: JULIO CESAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ**

EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, EN EL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ASESOR DEL TEMA: **DR. EDUARDO ANTONIO FERAT OSORIO**

(NOMBRE Y FIRMA)

SUPERVISOR TÉCNICO: **M. EN C. MIREILLE GUTIÉRREZ MENDOZA**

(NOMBRE Y FIRMA)

SUSTENTANTE: **ALDAIR SÁNCHEZ ANAYA**

(NOMBRE Y FIRMA)

DEDICATORIA

A MIS PADRES, ROCÍO Y ASCENSIÓN

POR EL AMOR, APOYO Y CONFIANZA QUE ME HAN BRINDADO SIEMPRE. MIL GRACIAS POR DARME UNA FAMILIA HERMOSA, POR INCULCAR EN MÍ BUENOS VALORES, POR ENSEÑARME CON EL EJEMPLO A NO RENDIRME Y CONSEGUIR TODO LO QUE ME PROPONGA, POR SUS PALABRAS DE ÁNIMO Y POR ESTAR CONMIGO EN TODO MOMENTO. SON EL TESORO MÁS GRANDE QUE TENGO Y GRACIAS A USTEDES HE PODIDO CULMINAR UN PROYECTO MÁS, QUE ES SUYO TAMBIÉN.

TODO LO QUE SOY EN LA VIDA ES POR USTEDES. ¡LOS AMO!

A MIS HERMANOS, OMAR Y STEPHANIE

GRACIAS POR ESTAR SIEMPRE A MI LADO, A PESAR DE MIS LOCURAS, POR SER EXCELENTES PERSONAS Y POR HACERME SIEMPRE TAN FELIZ CON SU SENTIDO DEL HUMOR TAN OCURRENTE. EL APOYO QUE ME HAN BRINDADO HA SIDO FUNDAMENTAL PARA LA REALIZACIÓN DE TODOS MIS PROYECTOS TANTO ESCOLARES COMO PERSONALES. ¡LOS QUIERO!

A MIS AMIGOS, FABIOLA Y ARTURO

POR LA AMISTAD TAN HERMOSA QUE HEMOS COMPARTIDO DURANTE TODOS ESTOS AÑOS Y POR TODAS LAS COSAS QUE HEMOS VIVIDO Y SEGUIREMOS VIVIENDO. ¡MEJORES PERSONAS NO PUDE HABER ENCONTRADO! SON PARTE FUNDAMENTA EN MI VIDA; LOS QUIERO CON TODAS MIS FUERZAS, HERMANO Y PAJERITA.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Isibasi por darme la oportunidad de integrarme a la unidad de investigación a su cargo, pero sobre todo por sus valiosas enseñanzas y consejos académico-personales que han servido en mi formación. Gracias por todo el apoyo brindado y por la confianza depositada en mí persona desde el inicio de este trabajo

Al Dr. Eduardo Antonio Ferat Osorio por permitirme trabajar en este proyecto, por su excelente asesoría y revisión, por el apoyo académico brindado siempre y por creer en mí en todo momento. Usted es un gran ejemplo a seguir, pues me ha demostrado que cualquier objetivo que uno se proponga es posible.

A la Dra. Lourdes Arriaga Pizano y al Dr. Constantino III Roberto López Macías quienes enriquecieron mi trabajo con sus correcciones, pero sobre todo gracias por la confianza depositada en mi persona y por buscar siempre la excelencia en todo lo que hacen. Gracias doctora Lulú por toda la ayuda prestada, es usted una excelente investigadora y una mejor persona. Gracias doctor Constantino por contagiarme con su entusiasmo y dedicación a la investigación.

A la M. en C. Mireille Gutiérrez Mendoza por los consejos dados para la realización y finalización de este proyecto. Sin tu asesoría, enseñanzas y revisión este trabajo simplemente no se hubiera podido realizar.

A la M. en C. Jaqueline Lizabeth Oliva Ramírez por ser una inmejorable profesora, compañera y amiga en todo momento tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por contagiarme siempre de tu buen humor y por ser tan buena conmigo. Por tu entusiasmo acabé por convencerme que quiero hacer de la inmunología mi vida.

A todos mis compañeros de la UIMIQ por los momentos tan gratos que he compartido a su lado, por sus enseñanzas antes y durante la realización de este trabajo y por hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia inolvidable rodeado siempre de un ambiente de trabajo estupendo. Agradezco en especial a mis compañeros Alexis, Eduardo, Ismael, Esteban y Luis Ángel por su ayuda incondicional y por todas las risas que hemos compartido. Ustedes me han demostrado que en la UIMIQ a parte de encontrar magníficos estudiantes-investigadores también hay magníficas personas.

Al Dr. Eduardo Pérez Salazar por permitirme trabajar en su laboratorio y por su asesoría en la interpretación de los resultados. Gracias también al Dr. Pedro Cortés Reynosa por sus enseñanzas y apoyo brindado en todo momento. Gracias en general a todos los compañeros del CINVESTAV por haberme apoyado en momentos difíciles en donde los experimentos no salían, pero sobre todo por el buen ambiente de trabajo que siempre ha caracterizado al laboratorio 42.

A todos los profesores y compañeros de la facultad de Química que han contribuido en mi formación, con especial énfasis al profesor Gustavo Garduño Sánchez por sus consejos siempre oportunos los cuales me permitieron mejorar como estudiante y como persona. Usted, aparte de buen profesor, es un excelente amigo en el que confió plenamente. ¡Gracias profe!

A mi familia y amigos; ustedes son la fuerza que me motiva día a día a dar más y a no rendirme. Gracias por apoyarme en todas las actividades y metas que me he propuesto, por todos los momentos y experiencias compartidas y por toda la ayuda, comprensión y amor con los que siempre me han rodeado. Los quiero mucho a todos y cada uno de ustedes.

ÍNDICE:

AVREVIATURAS	8
1. RESUMEN.....	10
2. INTRODUCCIÓN.....	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:.....	29
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:.....	30
5. HIPÓTESIS:.....	30
6. OBJETIVO GENERAL.....	31
7. OBJETIVOS PARTICULARES	31
8. MATERIAL Y MÉTODOS	32
8.1 Aislamiento y cultivo de células mononucleares humanas de sangre periférica	32
8.2 Cuantificación de endotoxina presente en la proteína humana recombinante Hsp70 mediante el ensayo del Lisado de Amebocitos del Limulus y determinación de su capacidad para inducir la activación celular	33
8.3 Determinación de la activación de CMHSP a nivel de secreción de TNF- α por medio de la técnica de ELISA.....	34
8.4 Evaluación de la participación de los receptores TLR-2 y TLR-4 en el reconocimiento de Hsp70 extracelular. Obtención de	

sobrenadantes y extractos nucleares de CMHSP estimuladas con Hsp70, LPS y PG.....	35
8.5 Hidratación, hibridación y marcaje radioactivo del oligonucleótido correspondiente a la secuencia consenso para el NF-kB.....	37
8.6 Determinación del nivel de activación del factor de transcripción NF-kB en las fracciones nucleares de las CMHSP por EMSA.....	38
9. RESULTADOS.....	40
10. DISCUSIÓN.....	49
11. CONCLUSIONES.....	53
ANEXO.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	58

ABREVIATURAS:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Apaf-1	Factor 1 activador de la proteasa apoptótica
APS	Persulfato de amonio
BDG	Buffer de Unión
CMHSP	Células Mononucleares Humanas de Sangre Periférica
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPA	Células Presentadoras de Antígeno
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamina Disódica
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima
EMSA	Ensayo de Retardo de la Movilidad Electroforética
EU	Unidades de Endotoxina
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Hidroxietil piperazina
HSE	Elemento Promotor del Choque Térmico
HSF-1	Factor de transcripción de las Proteínas del Choque Térmico-1 (Heat Shock Factor-1)
HSP70	Familia de las proteína del choque térmico de 70 KDa de peso molecular
Hsp70	Proteína del Choque Térmico de 72 KDa de Peso Molecular
IκB	Inhibidor del Factor Nuclear NF-κB
IKK	Cinasa de IκB
IL	Interleucina
iTLR-2	Anticuerpo Bloqueador anti-TLR2
iTLR-4	Anticuerpo Bloqueador anti-TLR4
JNK	Cinasa c-Jun NH ₂ -terminal
KDa	Kilodalton
KCl	Cloruro de potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato básico de potasio
LAL	Lisado de Amebocitos del Limulus
LPS	Lipopolisacárido
mA	Miliamper

MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaF	Fluoruro de Sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato Dibásico de Sodio
Na ₃ VO ₄	Vanadato de Sodio
NF-κB	Factor Nuclear κB
nm	Nanómetros
OPD	Ortofenilendiamina
PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PG	Peptidoglicana
pH	Potencial de Hidrógeno
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrones
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI 1640	Medio de Cultivo 1640 (Roswell Park Memorial Institute)
SFB	Suero Fetal Bovino
SIRS	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
SSI	Solución Salina Isotónica
TBE	Solución Reguladora de Ácido Bórico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
TLR	Receptor Tipo Toll
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa

1. RESUMEN

Las proteínas del choque térmico (HSP, por el acrónimo de Heat Shock Proteins) conforman una familia de proteínas intracelulares altamente conservadas a lo largo del proceso evolutivo y se ha reportado que participan en diversos procesos fisiológicos (normales y patológicos) y de protección celular. Algunos miembros pueden regular la respuesta inmunológica al sobreexpresarse intracelularmente, siendo la proteína de 72 KDa de peso molecular (Hsp70 o Hsp72) la integrante mayormente estudiada. Sin embargo, las propiedades inmunológicas de Hsp70 en el espacio extracelular son controversiales.

En un inicio la evidencia experimental permitió proponer a Hsp70 como una molécula capaz de estimular la producción de citocinas pro-inflamatorias (tales como TNF- α e IL-1 β) y de favorecer la maduración de células presentadoras de antígeno, como monocitos-macrófagos y células dendríticas. Estas propiedades inmunológicas sugieren la existencia de receptores de membrana para estas proteínas siendo los receptores tipo Toll, TLR-2 y TLR-4, unos de los mayormente estudiados. Diversos reportes señalan que la síntesis de citocinas pro-inflamatorias por efecto de la estimulación con Hsp70 es dependiente de la activación del factor transcripcional NF- κ B y que los receptores tipo Toll juegan un papel importante en la señalización y activación de esta vía.

Estudios recientes indican que la activación celular y la producción de citocinas inducidas por estimulación con Hsp70 puede deberse a contaminación de esta proteína recombinante con productos bacterianos como resultado de una purificación deficiente (la Hsp70 humana recombinante disponible en el mercado está hecha en un sistema bacteriano de *E. coli* por lo que la contaminación con lipopolisacárido (LPS) u otros productos bacterianos es muy probable); se ha observado que Hsp70 con alto grado de pureza (niveles bajos en LPS) no exhibe las propiedades pro-inflamatorias antes descritas, pero además, reduce la síntesis de citocinas pro-inflamatorias en modelos *in vivo* e *in vitro*.

A la fecha, no está claro el papel inmunológico de Hsp70 en el espacio extracelular ni los receptores involucrados en su reconocimiento. Por tal motivo, decidimos investigar si los receptores TLR-2 y TLR-4 están involucrados en el reconocimiento de esta proteína mediante la evaluación de la activación del factor transcripcional NF- κ B en células mononucleares humanas de sangre periférica estimuladas con Hsp70 recombinante con alto grado de pureza, en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueadores anti-TLR-2 y anti-TLR-4. Los resultados indican que ambos receptores son importantes en la activación de NF- κ B mediada por Hsp70, pues la activación de este factor transcripcional se suprime cuando se bloquean ambos receptores y no así cuando se bloquea uno solo de ellos. Además, se observó que Hsp70 regula negativamente la respuesta inflamatoria al disminuir la secreción de TNF- α en células estimuladas conjuntamente con LPS y Hsp70 en comparación con células estimuladas únicamente con LPS. Hsp70 *per se* no produjo la secreción de TNF- α descartándose así la idea de que Hsp70 es una molécula con propiedades pro-inflamatorias cuando se encuentra en el espacio extracelular.

2. INTRODUCCIÓN

Las proteínas de choque térmico (HSP) conforman una familia de proteínas intracelulares altamente conservadas a lo largo del proceso evolutivo y se encuentran en diversos compartimentos celulares (citosol, mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplásmico y núcleo) de eucariontes y procariontes, a excepción de algunas arqueobacterias (Kiang and Tsokos 1998; Kurucz, Tombor et al. 1999). El descubrimiento de estas proteínas se atribuye a Ferruccio Ritossa que en 1962 observó la activación de un grupo de genes en glándulas salivales de *Drosophyla melanogaster* cuando éstas fueron sometidas por equivocación a temperaturas elevadas (Ritossa 1996). En estudios posteriores, Tissieres y Mitchell identificaron el producto de estos genes y los nombraron proteínas del choque térmico, término que hace alusión a la cualidad que tienen estas proteínas de sobre-expresarse tras un choque de calor (Tissieres, Mitchell et al. 1974).

La mayoría de las células expresan HSP de manera constitutiva, siendo importantes para el desarrollo y crecimiento celular. Un pequeño porcentaje de estas proteínas son inducidas por estrés físico (choque térmico, radiación ultravioleta), químico (hipoxia, aminoácidos análogos, cambios de pH, compuestos tóxicos, especies reactivas del oxígeno, escasez de nutrientes, metales pesados) y biológico (factores de crecimiento, diferenciación celular, infecciones bacterianas y parasitarias), en un proceso conocido como “Respuesta al estrés”, siendo estas HSP vitales para la supervivencia celular, por lo que también se les conoce como proteínas del estrés (Lindquist and Craig 1988; Kopecek, Altmannova et al. 2001).

Es sorprendente que en condiciones normales estas proteínas comprendan del 5-10% del total de proteínas celulares y que tan sólo de 2 a 3 minutos después de un choque de calor (u otro factor estresante) se produzca RNA mensajero correspondientes a estas HSP y que lleguen a alcanzar más del 15% del total de las proteínas celulares. Estas características nos hablan de la importancia de las HSP para la supervivencia y protección celular, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés (Welch 1993).

Las condiciones estresantes para un organismo en particular son aquellas que salen de las fluctuaciones normales que enfrenta ese organismo. La respuesta al estrés y la sobre producción de HSP son fenómenos que se han conservado a través de la evolución y se correlaciona con la respuesta y resistencia de los organismos, permitiendo que la célula sobreviva bajo condiciones ambientales desfavorables (Donati, Slosman et al. 1990; Feder and Hofmann 1999). Por ejemplo, se ha observado que la sobreproducción de Hsp70 le confiere a la célula termotolerancia, definida como la capacidad que tiene la célula para resistir a un choque térmico después de una exposición subletal al calor (Kregel 2002).

Diversos análisis filogenéticos han demostrado que los organismos unicelulares poseen uno o dos genes de HSP, mientras que los multicelulares tienen cantidades considerablemente mayores. Hasta el momento se han identificado en mamíferos más de 40 genes que codifican para proteínas de choque térmico y estos se encuentran localizados en diversos cromosomas (Sonna, Fujita et al. 2002).

Existe controversia en cuanto a la clasificación de las HSP en familias. La clasificación mejor aceptada es aquella que utiliza como criterio determinante el tamaño molecular, obteniendo así las siguientes familias: HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, y las pequeñas proteínas del choque térmico (menores a 30 KDa), en donde el valor numérico indica el peso molecular aproximado en KDa. Las familias mejor estudiadas son HSP60, HSP70 y HSP90, siendo HSP70 el grupo mejor caracterizado y conservado evolutivamente. Algunos autores clasifican a las HSP en tres grupos, dependiendo a la forma en la que son inducidas: mayores (son de alto peso molecular y se presentan a 37°C, en ausencia de estrés), menores (se inducen por privación de glucosa) y de bajo peso molecular (se compone de proteínas de alrededor de 20 KDa) (Prohaszka and Fust 2004). Otros autores proponen una clasificación en base a su homología secuencial y funcional (Jaattela and Wissing 1992).

En humanos, la subfamilia HSP70 está conformada por lo menos de 12 miembros, los cuales poseen una gran homología secuencial y estructural, diferenciados unos de otros por su localización intracelular. Los integrantes mejor estudiados son Hsc70

o Hsp73, una chaperona citoplasmática expresada de manera constitutiva; Hsp70 o Hsp72, una chaperona citoplasmática expresada de manera inducible; Hsp75, una chaperona mitocondrial; y Hsp78, una chaperona expresada en el retículo endoplásmico (Gabriele, Tavaría et al. 1996). HSP70 constituye la subfamilia más abundante; en condiciones normales comprende del 3 al 4% del total de las proteínas solubles. Las principales funciones de sus integrantes son el plegamiento de péptidos nacientes, transporte de proteínas, regulación de la apoptosis, y mecanismos de protección celular.

La expresión de las formas constitutivas e inducibles de las HSP está regulado por distintos factores transcripcionales. En el caso de Hsp70, su factor transcripcional, HSF-1, se encuentra en estado inactivo en el citoplasma formando complejos con Hsp70 y Hsp90 principalmente. Tras un estímulo nocivo, como un choque de calor, se lleva a cabo la disociación entre HSF-1 y las proteínas del choque térmico. Posteriormente, HSF-1 se hiperfosforila, trimeriza y transloca hacia el núcleo en donde se une a los genes de Hsp70 en su secuencia promotora, denominada elemento del choque térmico (HSE), con lo que se lleva a cabo la transcripción y posterior su traducción.

La clasificación y las principales funciones de las HSP de mamíferos se encuentran resumidas en la siguiente tabla:

Principales familias e integrantes	Localización celular	Función celular
Pequeñas HSP		
α B-cristalina	Citoplasma	Estabilización del citoesqueleto
Hsp27	Citoplasma/núcleo	Cochaperona
Hemoxigenasa, Hsp32	Citoplasma	Regulador redox, propiedades antioxidantes
HSP40		
Hsp40	Citoplasma	Cooperación con Hsp70 y otras chaperonas en el plegamiento de péptidos recién sintetizados.
HSP60		
Hsp60	Mitocondria	Ambas: chaperonas y ensamblaje de complejos multiméricos.
TCP-1	Citoplasma	

HSP70		
Hsp70	Citoplasma/núcleo	Todos: Chaperonas de péptidos recién sintetizados; anti-agregantes proteicos. Hsp70 está involucrado en la regulación de factores de transcripción, incluyendo el propio: HSF-1
Hsc70	Citoplasma	
Grp78/BiP o Hsp78	Retículo endoplásmico	
Hsp75	Mitocondria	
HSP90		
Hsp90	Citoplasma	Todos: unión a proteínas; regulador de la actividad de otras proteínas, como los factores de transcripción; prevención de la agregación de péptidos; plegamiento de proteínas recién sintetizadas; facilitación de degradación proteolítica de proteínas dañadas.
Grp94/gp96/Hsp100	Retículo endoplásmico	
HSP110		
Hsp110	Núcleo/citoplasma	Tolerancia térmica
Hsp105	Citoplasma	Plegamiento de proteínas

2.1 Estructura básica de las HSP

A excepción de las pequeñas proteínas del choque térmico, todas las HSP poseen en su estructura un dominio amino terminal (N-terminal) altamente conservado, con actividad de ATPasa, y un dominio variable carboxilo terminal (C-terminal) que tiene la capacidad de interactuar promiscuamente con regiones proteicas hidrófobas. Las proteínas nativas poseen sus dominios hidrófobos localizados hacia el interior de su estructura y sólo las proteínas mal plegadas o desnaturalizadas exhiben sus regiones hidrófobas, lo cual permite que entren en contacto con el dominio C-terminal de las HSP. Después de eso, los polipéptidos son re-plegados, reemplazados, restaurados o degradados (péptidos que no pueden ser reparados) en un proceso dependiente de la actividad ATPasa de las HSP.

La estructura de Hsp70 consiste en un dominio N-terminal con actividad de ATPasa, con un peso molecular de 45 KDa, y de un dominio C-terminal de unión al sustrato con un peso de 25 KDa, el cual a su vez se encuentra subdividido en un subdominio β -sándwich de 15 KDa, que actúa como hendidura de unión al péptido, y un subdominio α -helicoidal de 10 KDa que funciona como tapa para cubrir el sitio de

unión al péptido (Zhu, Zhao et al. 1996; Morshauser, Hu et al. 1999). En la *Imagen 1* se muestra una representación de la estructura secundaria de Hsp70 humana.

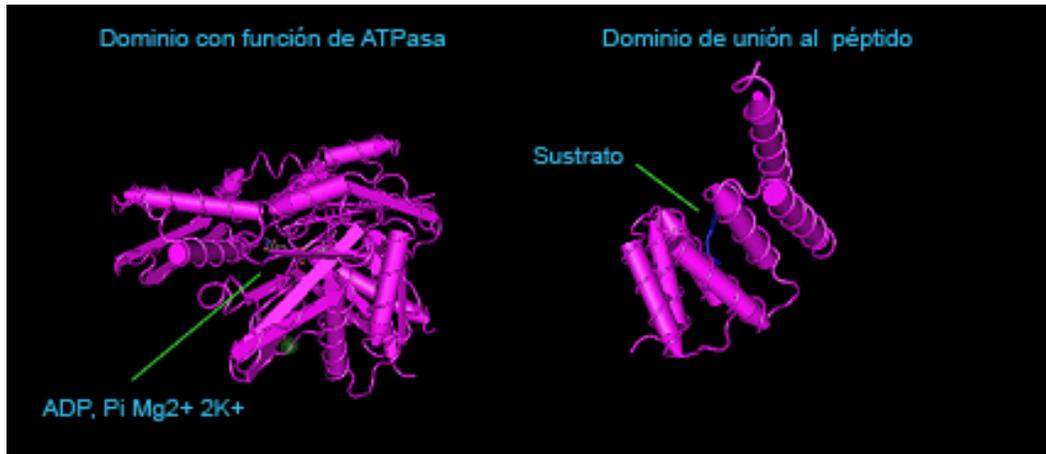


Imagen 1. Estructura secundaria de Hsp70 humana. A la izquierda se muestra la representación del dominio con función de ATPasa (N-terminal) formando un complejo con ADP, fosfato inorgánico y dos iones potasio y a la derecha se muestra la estructura del dominio de unión al sustrato (C-terminal).

2.2 Funciones biológicas de las HSP

La primera función reconocida de las HSP fue como chaperonas celulares: pueden unirse transitoriamente a otras proteínas mal plegadas, estabilizarlas a través de un proceso de unión-liberación regulado (mediado por hidrólisis de ATP) y facilitar la adquisición de su estructura tridimensional correcta (Agashe and Hartl 2000). Además, participan en el transporte intracelular de polipéptidos a través de diversos organelos, en el ensamblaje de compuestos oligoméricos (por ejemplo, ayudan a ensamblar los complejos de la RNA polimerasa II), en el cambio conformacional de estructuras inactivas a sus formas activas, en la regulación del estado redox celular, en la regulación de la actividad de factores de transcripción y en la degradación de proteínas que no pueden ser reparadas mediante un mecanismo dependiente del proteosoma o por autofagosomas (Hendrick and Hartl 1993; Otterbein and Choi 2000). En la *Imagen 2* se resumen las principales funciones de las HSP.

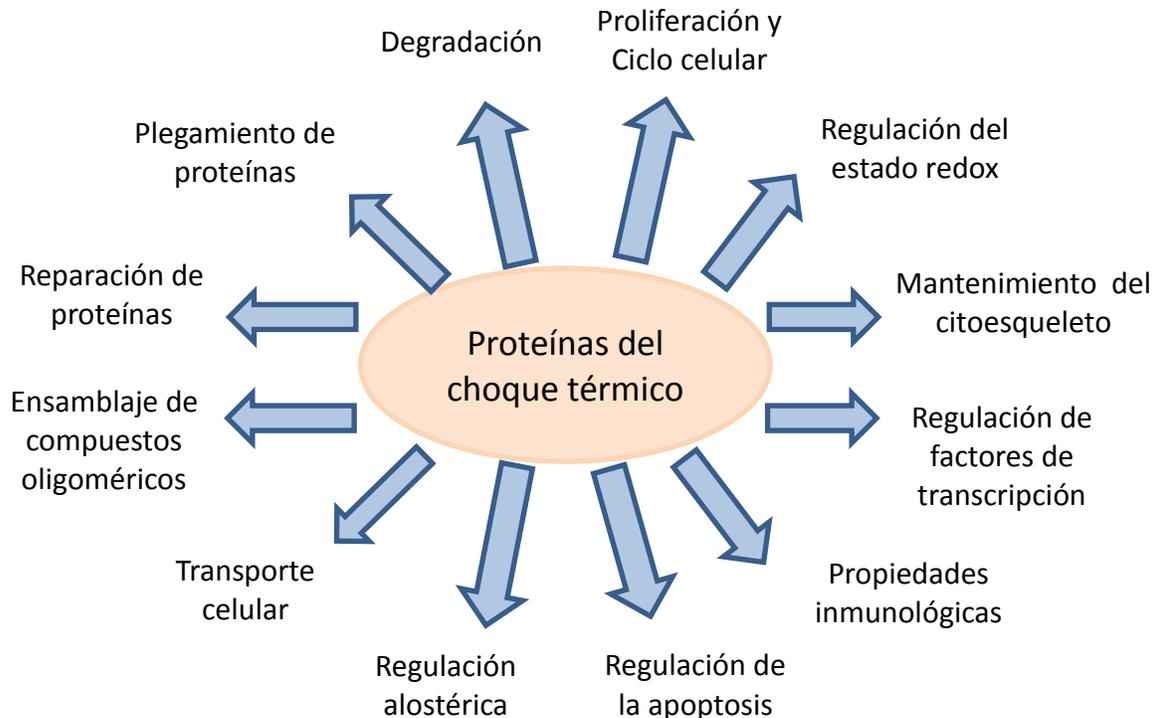


Imagen 2. Funciones fisiológicas de las proteínas del choque térmico

También se ha descrito la participación de HSP en el ensamblaje y mantenimiento del citoesqueleto, un complejo conjunto de estructuras constituidas por microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, que tiene un papel fundamental en la morfología y polaridad celular. En las neuronas, el citoesqueleto ejerce funciones importantes en las sinapsis y en la capacidad de conducción de los estímulos nerviosos lo cual es necesario para una adecuada comunicación sináptica (Benitez-King, Ortiz-Lopez et al. 2006). Por lo tanto, las HSP son fundamentales para un buen funcionamiento de la actividad cerebral. De hecho, se ha documentado que diversos trastornos neurodegenerativos caracterizados por la acumulación de agregados proteicos, desorganización del citoesqueleto, altos niveles de estrés oxidativo y apoptosis se relaciona con deficiencias en la actividad de las HSP.

Para cumplir con su función como chaperonas, se requiere de la asociación entre HSP de alto peso molecular, como por ejemplo Hsp70, con otras HSP de menor tamaño, en cuyo caso funcionan como cochaperonas (Minami, Hohfeld et al. 1996; Martin, Mestril et al. 1997). Los mecanismos básicos de cooperación entre algunas

HSP y chaperonas dependientes de ATP parecen estar conservadas tanto en bacterias como en humanos. Las HSP, a diferencia de otras chaperonas, son capaces de interactuar con varios sustratos de manera coordinada y con especificidad aún no bien descrita (Lee, Roseman et al. 1997; Haslbeck, Walke et al. 1999; Haslbeck, Franzmann et al. 2005).

En la *Imagen 3* se esquematiza la asociación entre pequeñas proteínas del choque térmico con Hsp70, a fin de cumplir con su función como chaperonas y anti-agregantes proteicos. Es fundamental que esta cooperación se lleve de manera coordinada, sobre todo cuando la célula se encuentra bajo condiciones de estrés, a fin de asegurar el bienestar celular. Por ejemplo, la proteína Hsp27 puede funcionar como amortiguador para el desdoblamiento de intermediarios de proteínas desnaturalizadas, hasta que Hsp70 adquiera su actividad como chaperona, a fin de renaturalizar las proteínas dañadas (Ehrnsperger, Graber et al. 1997). Se ha descrito que Hsp70 puede formar heterodímeros con otras proteínas tales Hsp40, Hsp110 y pequeñas proteínas del choque térmico (como Hsp27), pero no hay evidencia de que forme homodímeros (Fan, Lee et al. 2003).

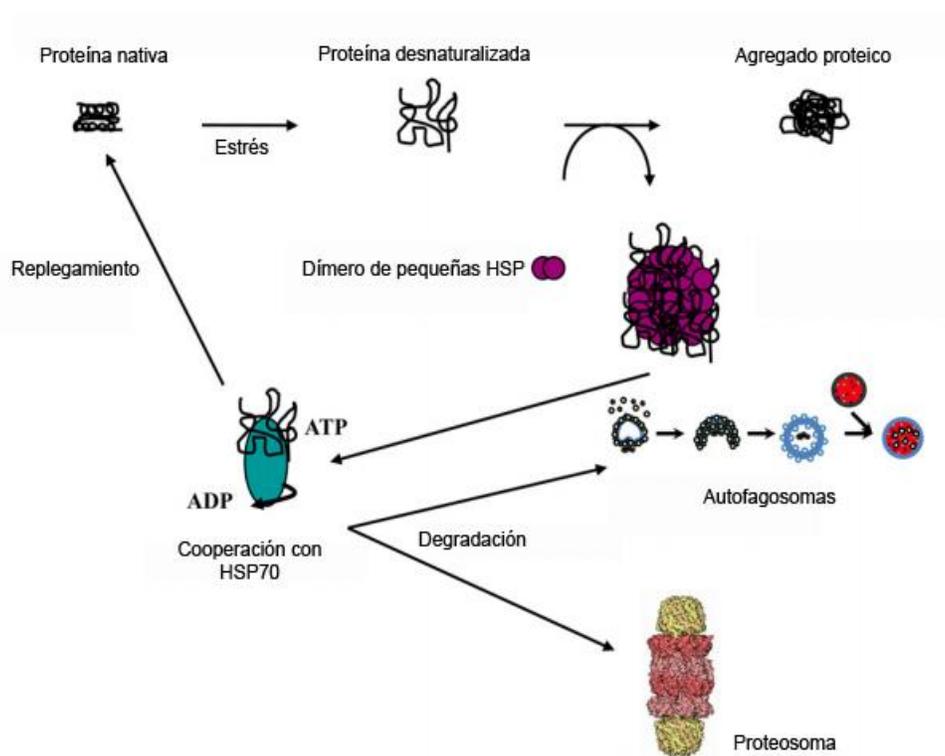


Imagen 3. La función anti-agregante de la Hsp70 depende de la asociación con otros miembros de las HSP como por ejemplo las pequeñas proteínas del choque térmico y con otras cochaperonas (Garrido, Paul et al. 2012).

Las HSP poseen propiedades citoprotectoras debido a que pueden unirse, estabilizar y evitar la desnaturalización de proteínas en células que cursan por estados de estrés, evitando así la muerte celular por pérdida de proteínas que cumplen funciones metabólicas importantes o debido a la acumulación de agregados proteicos.

La actividad citoprotectora de Hsp70 también se relaciona con su capacidad de inhibir la activación del Factor Nuclear kappaB (NF- κ B), un factor transcripcional encontrado en la mayoría de las células animales y que está involucrado en la respuesta inflamatoria. Al regular negativamente la activación de este factor, Hsp70 provoca la disminución de la transcripción genética de mediadores inflamatorios, entre los que se encuentra el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), una citocina clave involucrada en la respuesta inflamatoria y en la inducción de apoptosis.

NF- κ B está conformada por cinco miembros: NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB y c-Rel. Estas proteínas se encuentran en el citoplasma formando homo o heterodímeros entre sí, y están en estado inactivo, por interacción con la proteína inhibidora del NF- κ B (I κ B), pero en esencia, están listos para ser activados y responder rápidamente. Diversas moléculas son capaces de activar a las proteínas del NF- κ B para lo que es necesario, primeramente, su reconocimiento mediado por receptores. Dentro de los receptores de la inmunidad innata se encuentra los Receptores Tipo Toll (TLRs), una subfamilia de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) encargados de reconocer a Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), moléculas altamente conservadas y esenciales para la supervivencia de los microorganismos (Akira, Uematsu et al. 2006), entre los que se encuentran el lipopolisacárido y la peptidoglicana.

Los TLRs tienen alta capacidad de iniciar la respuesta inflamatoria y son expresados por macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T, fibroblastos y células epiteliales. Actualmente se conocen diez diferentes TLRs en humanos, pero el número de ligandos reconocidos para cada receptor va en aumento. La mayoría de los TLRs se expresan en la membrana celular y solamente 3 de ellos (TLR-3, TLR-7 y TLR-9) se encuentran dentro de vesículas endosómicas en el citoplasma y son importantes para la detección de microorganismos intracelulares.

La interacción de TLR con su agonista favorece el reclutamiento de proteínas adaptadoras con dominio TIR como: MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM (Manicassamy and Pulendran 2009). Ambas establecen una interacción tipo TIR-TIR, lo cual resulta en el reclutamiento de proteínas de la familia IRAK: IRAK1, IRAK2, IRAK4 e IRAK-M, y el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6). El reclutamiento de este complejo produce la activación de las MAP cinasas (ERK, JNK y p38) y del complejo IKK, una cinasa encargada de fosforilar y favorecer la eliminación, vía proteosoma, de I κ B, lo que trae como consecuencia la activación y translocación nuclear de NF- κ B con la consecuente transcripción genética de mediadores inflamatorios.

Se ha reportado que Hsp70 puede interaccionar físicamente con moléculas involucradas en diversas vías de señalización celular, entre ellas TRAF6. Esta interacción inhibe la función normal de la proteína con que interacciona, impidiendo así que la vía se desarrolle de manera normal. La interacción de Hsp70 con TRAF6 previene su ubiquitinación con lo que pierde la capacidad de activar a otras moléculas importantes en la vía del NF- κ B y por lo tanto, inhibe la transcripción de mediadores inflamatorios dependientes de este factor transcripcional (*Imagen 4*) (Chen, Wu et al. 2006).

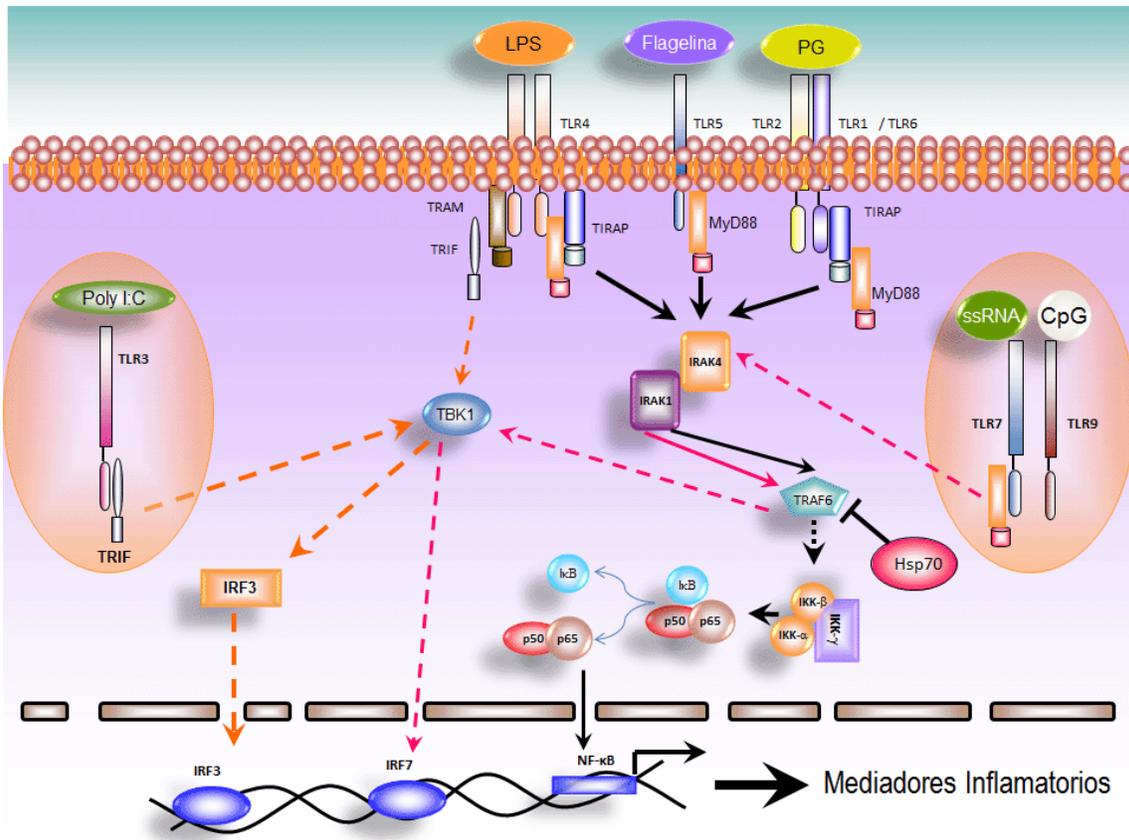


Imagen 4. El reconocimiento de PAMPs por los TLRs genera la activación de distintos factores transcripcionales como IRF3, IRF7 y NF-κB. La vía del NF-κB involucra diversas moléculas adaptadoras (MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM) y proteínas de la familia IRAK, como TRAF6, que se activan de manera de secuencial y culminan con la activación de IKK, el cual a su vez se encarga de fosforilar a IκB con lo que se produce la liberación y translocación nuclear del dímero de NF-κB (el heterodímero p50/p65 es uno de los mejores conocidos por promover la transcripción genética de mediadores inflamatorios). Se ha observado que Hsp70 puede interaccionar físicamente con TRAF6 inhibiendo la activación de la vía del NF-κB, (Imagen tomada de Ferat, O. Análisis del papel de TREM-1 y Hsp70 en la respuesta inflamatoria, estudios *in vivo* e *in-vitro*. México, 2010. Presentada en la Universidad Nacional Autónoma de México, para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas).

Se ha documentado que HSP son capaces de regular la apoptosis, un tipo de muerte celular esencial durante la embriogénesis y, después durante la vida del organismo, en el aseguramiento de la homeostasis. Existen dos vías de activación de la apoptosis: la vía intrínseca, que involucra señales intracelulares de estrés que

provocan la permeabilización de la mitocondria con la subsecuente liberación del citocromo C y otras moléculas proapoptóticas, (en un proceso mediado por proteínas de la familia Bcl-2), y la vía extrínseca, que es mediada por receptores de la familia del factor de necrosis tumoral (RTNF). Ambas vías requieren de la activación de proteasas denominadas caspasas, una familia de proteínas importantes para el desarrollo de la apoptosis.

En estado basal, Hsp70 puede modular la apoptosis a través de distintos mecanismos, como por ejemplo, mediante la inhibición de la liberación del citocromo C, a través de la inhibición de ASK-1 (cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis), una proteína importante para la activación de JNK (cinasa c-Jun NH₂-terminal) (Gabai, Yaglom et al. 2000; Park, Cho et al. 2002). JNK está directamente involucrada en la movilización de Bax (un miembro de la familia de Bcl-2) en la membrana mitocondrial, por lo que su inhibición impide la liberación de mediadores pro-apoptóticos, incluyendo al citocromo C. También se ha reportado que Hsp70 puede interactuar físicamente con JNK, impidiendo que señalice y cumpla con su función pro-apoptótica (Tsuruta, Sunayama et al. 2004).

Asimismo, Hsp70 puede reprimir la formación del apoptosoma (complejo protéico formado por el citocromo C, Apaf-1 y por la pro-caspasa 9) (Li, Nijhawan et al. 1997) mediante la interacción con la proteína Apaf-1 (factor-1 activador de la proteasa apoptótica), impidiendo con esto el reclutamiento de pro-caspasa-9, una enzima importante para la iniciación de la apoptosis. (Beere, Wolf et al. 2000). Del mismo modo, Hsp70 interacciona e inhibe a moléculas pro-apoptóticas tales como el factor inductor de la apoptosis (AIF), una proteína mitocondrial que al ser liberada se moviliza hacia el núcleo y genera la muerte celular por condensación de la cromatina (Susin, Lorenzo et al. 1999; Joza, Susin et al. 2001).

La apoptosis mediada por TNF- α y Fas ligando (vía extrínseca) también puede ser regulada negativamente por Hsp70, en un mecanismo que involucra la inhibición de la proteína Bid, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 que al ser activado migra hacia la mitocondria y produce la liberación del citocromo C, con la posterior

formación del apoptosoma y muerte celular por apoptosis (Gabai, Mabuchi et al. 2002).

Hsp70 puede inhibir la apoptosis en fases tardías mediante la inhibición de la activación de la caspasa-3, una proteasa involucrada directamente en la activación de la DNAasa CAD (DNAasa activada por caspasa), que es la enzima encargada de digerir al DNA nuclear (Sakahira and Nagata 2002).

En la *Imagen 5* se resumen los mecanismos antes descritos mediante los que Hsp70 inhibe la apoptosis celular.

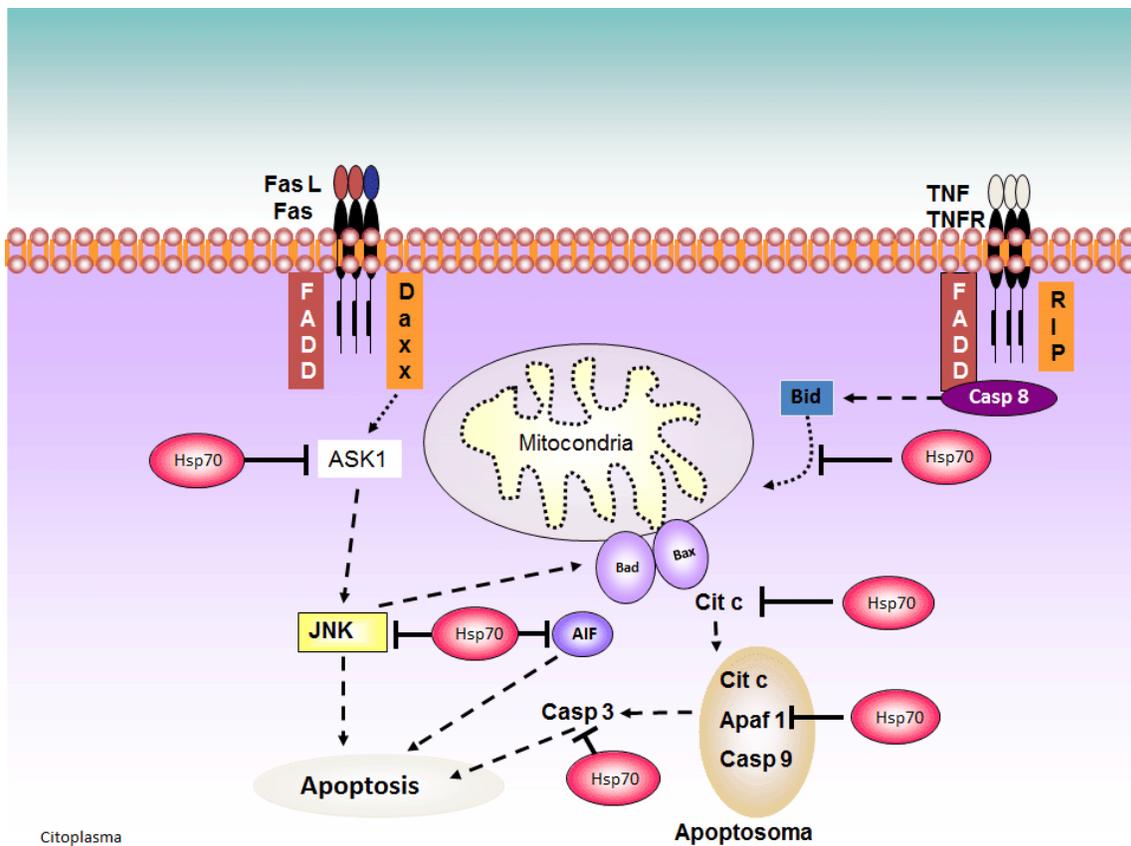


Imagen 5. Hsp70 inhibe la apoptosis celular por interacción con proteínas importantes para la activación de la vía intrínseca y extrínseca, tanto en etapas tempranas como tardías. (Imagen tomada de Ferat, O. Eduardo. Análisis del papel de TREM-1 y Hsp70 en la respuesta inflamatoria, estudios *in vivo* e *in-vitro*. México. 2010. Presentada en la Universidad Nacional Autónoma de México, para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas).

2.3 Hsp70 extracelular y su rol inmunológico

A diferencia de las funciones intracelulares de Hsp70, poco se sabe con respecto a su actividad en el compartimento extracelular. Fue sorprendente descubrir que, a pesar de ser las proteínas mejor conservadas evolutivamente, las HSP pueden ser antígenos inmunogénicos, capaces de ser reconocidos por linfocitos T; se ha reportado la generación de una fuerte respuesta de anticuerpos IgG dirigidos hacia HSP de diversas micobacterias (Bonorino, Nardi et al. 1998). Un análisis detallado de los péptidos reconocidos por las células T revela que algunos de ellos son altamente conservados (Quayle, Wilson et al. 1992), lo que permitió hipotetizar que las HSP pueden generar autoinmunidad debido a la alta homología de las proteínas propias con las de otros organismos, incluyendo bacterias (hasta un 60% para el caso de la familia de las HSP60). Diversas investigaciones han implicado a miembros de HSP60 con el desarrollo de enfermedades autoinmunes como artritis y diabetes, probablemente por reactividad cruzada con anticuerpos producidos hacia HSP60 bacterianas (Res, Schaar et al. 1988; Pope, Lovis et al. 1992; Roep 1996). Por otra parte, existen reportes de que los miembros de HSP70 pueden proteger contra enfermedades autoinmunes y se ha documentado que Hsp71 de *Micobacterium tuberculosis* pueden modular la inducción experimental de artritis en ratones, probablemente por la inducción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 en un mecanismo dependiente de TLR-2 (Kingston, Hicks et al. 1996; Wendling, Paul et al. 2000); (Saraiva and O'Garra 2010).

El hallazgo de anticuerpos anti-Hsp70 en pacientes con enfermedades autoinmunes permitió especular que esta proteína probablemente tuviera alguna propiedad inmunológica cuando se encuentra en el espacio extracelular. Una de las primeras interrogantes que surgió fue cómo una proteína intracelular podía encontrarse en el espacio extracelular. Existen dos teorías bien fundamentadas que explican este fenómeno: por liberación pasiva (sin gasto energético) y por liberación activa (con gasto energético). La teoría de la liberación pasiva se formuló por una serie de experimentos en los que se demostró que Hsp70 es liberada al medio extracelular por daño celular, como por ejemplo durante necrosis, pero no así por células que

mueren por apoptosis (el contenido intracelular queda retenido en el cuerpo apoptótico) (Basu and Srivastava 2000; Srivastava and Amato 2001; Pittet, Lee et al. 2002). Diversos estudios reportan incremento de Hsp70 en suero de pacientes que cursan por un traumatismo severo, como por ejemplo cirugías (Pittet, Lee et al. 2002).

Por otra parte, la teoría de la liberación activa se fundamentó en tres evidencias: 1) Pockley y colaboradores demostraron la presencia de anticuerpos anti-Hsp70 en circulación de individuos sanos (Pockley, Shepherd et al. 1998). 2) Guzhova y colaboradores, demostraron que Hsp70 se libera de células de la glía en ausencia de muerte por necrosis (Guzhova, Kislyakova et al. 2001). 3) Fleshner y colaboradores demostraron el aumento extracelular de Hsp70 en animales sometidos a estrés psicológico en el que no ocurre muerte celular (Fleshner, Campisi et al. 2004). También se ha observado que la exposición a ciertas citocinas pro-inflamatorias, incluyendo IFN- γ e IL-10, genera la liberación de Hsp70 sin inducir necrosis celular. Estudios posteriores develaron que Hsp70 es liberada activamente en un proceso dependiente de cuerpos multivesiculares, denominados exosomas (Raposo, Nijman et al. 1996; Zitvogel, Regnault et al. 1998; Zitvogel, Fernandez et al. 1999).

Algunos autores propusieron que probablemente la liberación de Hsp70 pudiera servir como señal de alarma ante daño celular, pues se observó que la estimulación con sobrenadantes de células que habían muerto por necrosis eran capaces de generar una fuerte respuesta inflamatoria. La estimulación de células presentadoras de antígeno (CPA) con Hsp70 recombinante, favorece la inducción de citocinas tales como el TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 (Asea, Kabingu et al. 2000; Asea, Kraeft et al. 2000), GM-CSF (Srivastava 2002), óxido nítrico (Panjwani, Popova et al. 2002), y quimiocinas como MIP-1, MCP-1 y RANTES (Lehner, Bergmeier et al. 2000). Diversos trabajos en modelos animales y humanos demuestran que Hsp70 puede inducir la maduración de CPA y generar la expresión de moléculas de coestimulación, como CD40, CD83, CD86 y moléculas de histocompatibilidad de clase 2 (MHC-II) (Basu, Binder et al. 2000; Somersan, Larsson et al. 2001), al igual de provocar la movilización de células NK (Gastpar, Gehrman et al. 2005) y células

dendríticas (Binder, Anderson et al. 2000). En conjunto, estos resultados sugieren que Hsp70 es un potente inductor del sistema inmunológico.

Un prerrequisito para iniciar la respuesta inmune es el reconocimiento del antígeno a través de receptores de la inmunidad innata, lo cual provocará la activación de diversas vías de señalización intracelular (Basu, Binder et al. 2000; Noessner, Gastpar et al. 2002). Varios estudios muestran que Hsp70 puede unirse a la superficie celular de monocitos/macrófagos (Sondermann, Becker et al. 2000), células NK (Gross, Hansch et al. 2003), células dendríticas y linfocitos B pero no se adhiere a la superficie de los linfocitos T (Arnold-Schild, Hanau et al. 1999) lo cual sugiere su interacción con receptores presentes en estos tipos celulares.

Diversas moléculas se han propuesto como receptores para Hsp70. Inicialmente, se pensaba que los PRRs respondían exclusivamente hacia moléculas exógenas, pero hoy se sabe que estos receptores también pueden reconocer moléculas endógenas, denominadas alarminas, que junto con los PAMPs conforman a los Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs) y sirven como señal de alarma para iniciar una respuesta inflamatoria (Matzinger 1998). Dentro de las moléculas que se han propuesto como probables receptores para Hsp70 se encuentran: CD14 (Asea, Kraeft et al. 2000) y los receptores tipo Toll, TLR-2 y TLR-4 (Asea, Rehli et al. 2002), los receptores Scavenger CD36 (Delneste, Magistrelli et al. 2002), SR-A (Haworth, Platt et al. 1997; Berwin, Hart et al. 2003), CD91 (Binder, Han et al. 2000; Binder and Srivastava 2004), LOX-1 (Delneste, Magistrelli et al. 2002) y CD40 (Becker, Hartl et al. 2002). Los receptores tipo Toll conforman la familia de receptores mayormente citados y se ha reportado que su interacción con Hsp70 induce la secreción de citocinas, incluyendo TNF- α , en una vía dependiente de la activación del factor transcripcional NF- κ B.(Asea, Kraeft et al. 2000).

Posteriormente, algunos grupos demostraron que la capacidad de Hsp70 de activar al sistema inmunológico era producto de contaminación con compuestos bacterianos. La idea de la contaminación con LPS surgió debido a que Hsp70 humana recombinante se obtiene en un modelo de *E. coli* por lo que al extraer la proteína de interés es muy probable que vaya acompañada con moléculas bacterianas, siendo el

LPS el mayor contaminante. Además, las propiedades inmunológicas mostradas por Hsp70 son muy parecidas a las exhibidas por el LPS (Gao and Tsan 2003; Gao and Tsan 2004).

Wallin y colaboradores observaron que Hsp70 de alto grado de pureza, extraída de hígado de ratones, no inducía la secreción de citocinas, pero sí lo hacía cuando se encontraba contaminada con lipopolisacárido (Wallin, Lundqvist et al. 2002). Bausinger y colaboradores observaron que el pre-tratamiento de Hsp70 con polimixina B (un antagonista del LPS) era incapaz de activar células dendríticas (Bausinger, Lipsker et al. 2002). Gao y Tsan demostraron que Hsp70 con alto grado de pureza no genera la liberación de TNF- α mientras que una muestra de Hsp70 que no pasó por un proceso estricto de purificación sí era capaz de inducir la liberación de esta citocina. Hsp70 es una proteína con alta afinidad hacia moléculas hidrófobas (Tsan and Gao 2009) por lo que la eliminación eficiente de contaminantes es un proceso complicado. En conjunto, estos resultados indicaban que Hsp70 no es una molécula con propiedades pro-inflamatorias y que probablemente los resultados en cuanto a la secreción de citocinas, maduración de células presentadoras de antígeno, interacción con receptores de membrana y la activación de la cascada del NF- κ B, se deben a la contaminación con LPS y otros productos bacterianos. En oposición, se ha observado que Hsp70 induce la activación de NF- κ B en un mecanismo diferente al provocado por el LPS (la interacción de Hsp70 con la membrana celular de CPA induce la liberación intracelular de calcio, pero no así el LPS) lo cual ha servido para que distintos autores sostengan que Hsp70 es una molécula capaz de ser reconocida por CPA y de generar su activación (McLeish, Dean et al. 1989; Asea, Kraeft et al. 2000).

Artículos recientes indican que la estimulación con Hsp70 libre de endotoxina tiene propiedades anti-inflamatorias por inducción de IL-10 y por reducción de TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1 e IFN- γ tanto en modelos *in vivo* (Detanico, Rodrigues et al. 2004) como *in vitro* (Luo, Zuo et al. 2008; Luo, Zuo et al. 2008). Por otro lado, en modelos *in vitro* de células de hámster transfectadas con cDNAs de los receptores propuestos para Hsp70, se ha observado que Hsp70 no se une a células que expresan TLR-2, TLR-4,

CD40 y CD91, pero sí a células que expresan LOX-1, SREC-1 y FEEL-1 (Theriault, Adachi et al. 2006). Sin embargo, en otros reportes se contradice la actividad antiinflamatoria de Hsp70 extracelular, por ejemplo, modelos *in vivo* muestran que Hsp70 agrava la condición inflamatoria de pancreatitis inducida en ratones en un mecanismo dependiente de TLR-4 (Song, Liu et al. 2008); otros reportes señalan que los receptores TLR-2 y TLR-4 son fundamentales para que Hsp70 induzca la activación y proliferación de células T citotóxicas (Gong, Zhu et al. 2009) y la maduración de células dendríticas (Enomoto, Bharti et al. 2006).

En la actualidad, existe una gran cantidad de literatura que apoya la idea de que Hsp70 es una alarmina que actúa a través de la activación de NF- κ B en un mecanismo dependiente de TLRs y de otros receptores de membrana, sin embargo, también existen reportes en los que se muestra que Hsp70 posee actividad antiinflamatoria y que no es reconocida por los receptores tipo Toll. Por todo esto, la actividad inflamatoria de Hsp70 en el espacio extracelular sigue siendo controversial, por lo que es fundamental el aporte de evidencia que permita determinar el papel inmunológico de esta proteína. Es importante el estudio de Hsp70 puesto que se ha propuesto como un posible blanco terapéutico para el tratamiento de diversas patologías que involucran una sobre-activación del sistema inmunológico por su actividad antiinflamatoria y por otro lado se ha propuesto como adyuvante en la fabricación de vacunas por su capacidad de activar células presentadoras de antígeno.

3. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

En el 2002 A. Asea y colaboradores propusieron por primera vez que el reconocimiento de Hsp70 a través de TLR-2 y TLR-4 conlleva a la activación del factor transcripcional NF- κ B y a la posterior transcripción genética y secreción de mediadores inflamatorios, tales como TNF- α . Por ser una molécula endógena con capacidad de inducir una respuesta pro-inflamatoria, Hsp70 fue clasificada como alarmina y le dieron el sobrenombre de chaperocina por su actividad dual tanto como chaperona como por inducir una respuesta inflamatoria. Un año más tarde, Gao y Tsan reportaron que la respuesta inflamatoria observada por Asea y su grupo, era resultado de la contaminación de Hsp70 con productos microbianos, principalmente lipopolisacárido (LPS). Son varios los reportes con resultados que apoyan el papel de Hsp70 como chaperocina capaz de inducir una respuesta inflamatoria a través de la activación de NF- κ B y secreción de TNF- α , en un proceso dependiente de TLR-2 y TLR-4, pero también existen otros reportes que apoyan la teoría de la contaminación por LPS. Actualmente ambas propuestas están ampliamente apoyadas en la literatura, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, por lo que la actividad inmunológica de Hsp70 en el espacio extracelular sigue siendo controversial. Por lo anterior expuesto, en este proyecto nos interesa aportar evidencia, utilizando un modelo diferente a los utilizados hasta el momento, a fin de determinar si Hsp70 de alta pureza es capaz de inducir una respuesta inmunológica, al generar la secreción de TNF- α , y si esta puede ser a través de su reconocimiento por receptores tipo Toll, TLR-2 y TLR-4, por activación del factor de transcripción NF- κ B.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Hsp70 es agonista de receptores tipo Toll, TLR-2 y TLR-4, e induce la secreción de TNF- α ?

5. HIPÓTESIS

Hsp70 es agonista de receptores tipo Toll TLR-2 y TLR-4, e induce la secreción de TNF- α .

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si Hsp70 es agonista de receptores tipo Toll TLR-2 y TLR-4 e induce la secreción de TNF- α .

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Evaluar el efecto agonista de Hsp70 sobre células mononucleares estimuladas con Hsp70 en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueadores de TLR-2 y TLR-4, a través de la técnica de EMSA.
- b) Evaluar si la estimulación de células mononucleares con Hsp70 genera la liberación de TNF- α , mediante la técnica de ELISA.
- c) Evaluar la contribución del LPS en la activación del NF- κ B y liberación de TNF- α a través de la determinación de la cantidad de LPS que contiene la muestra de Hsp70, mediante el ensayo del lisado de amebocitos del Limulus cromogénico.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Aislamiento y cultivo de células mononucleares humanas de sangre periférica (CMHSP).

Para evaluar la actividad inmunológica de Hsp70 decidimos utilizar un modelo *in vitro* que consiste en medir la activación del factor transcripcional NF- κ B y la inducción de TNF- α en células mononucleares humanas de sangre periférica estimuladas con Hsp70 de alta pureza (niveles bajos de LPS). Las CMHSP fueron obtenidas a partir de concentrados leucocitarios (Buffy Coat) de varones sanos, donados por el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI y se aislaron mediante gradiente con ficoll (todo en condiciones de esterilidad): se colocaron 80 mL de PBS frío en un frasco de vidrio despirogenizado y se añadió el contenido de una bolsa de Buffy Coat (80 mL aproximadamente) y se mezcló lentamente haciendo uso de una pipeta de 10 mL (esta mezcla corresponde a una dilución 1:2); a continuación, se tomó la mezcla de sangre en PBS y se agregó lentamente por las paredes dos tubos Falcon de 50 mL a los que previamente se les había colocado 15 mL de Ficoll (LymphoPrep™), teniendo el cuidado de no romper el gradiente y se centrifugaron a 3500 rpm durante 30 minutos a 18 °C con una aceleración del rotor de 1 y sin freno. Transcurrido el tiempo de centrifugación, se tomó la capa correspondiente a las células mononucleares con ayuda de una pipeta de transferencia y se trasvasó a otro tubo Falcon estéril de 50 mL vertiendo el contenido lentamente por las paredes del tubo para posteriormente añadir con lentitud PBS hasta llevar a un volumen de 50 mL con el fin de lavar las células; para realizar el lavado se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos y 18 °C con máxima aceleración y freno del rotor. Posteriormente, se decantó el líquido del tubo Falcon y se resuspendió el botón. Las células se lavaron dos veces más a 1000 y 900 rpm respectivamente. Después del último lavado, el botón se resuspendió en 2 mL de medio RPMI suplementado (L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina G 100 U/mL y sulfato de estreptomicina 100 μ g/mL) y se contó el número de células usando cámara de Neubauer con azul de Tripano.

Se colocaron 1×10^6 células/pozo en un mililitro de medio RPMI suplementado, en una placa de cultivo de 12 pozos y se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% de CO_2 ; transcurrido el tiempo de incubación se lavó por duplicado cada pozo usando 1 mL de PBS estéril atemperado con el fin de seleccionar únicamente las células adheridas a la placa, que corresponden aproximadamente a un 50% de monocitos. Por último, se añadió a cada pozo 1 mL de medio RPMI suplementado y se dejó incubar durante 24 horas a las condiciones antes mencionadas, hasta el momento de su estimulación.

8.2 Cuantificación de endotoxina presente en la proteína humana recombinante Hsp70 mediante el ensayo del Límulus y determinación de su capacidad para inducir la activación celular.

Para determinar si los receptores tipo Toll, TLR-2 y TLR-4 están implicados en el reconocimiento extracelular de Hsp70 es fundamental tener la certeza de que los resultados obtenidos por estimulación de CMHSP con Hsp70 serán inherentes a la proteína y no a contaminación por LPS. Para esto, se adquirió Hsp70 humana recombinante baja en lipopolisacárido y se determinó la concentración de LPS mediante la prueba del lisado de amebocitos de Límulus cromogénico.

Para la realización del ensayo de Límulus primeramente se hidrató el estándar de LPS (*E. coli* O55:55) y el vial del Lisado de Amebocitos del Limulus (LAL) según las especificaciones del proveedor. Se adicionaron 900 μL de agua libre de pirógenos a cuatro tubos de 13 x 100, igualmente libres de pirógenos, rotulados como 0.01 EU/mL, 0.1 EU/mL, 1.0 EU/mL y 10 EU/mL respectivamente (estos tubos servirán para realizar una curva estándar para LPS). A continuación, se tomaron 100 μL del estándar de LPS, previamente agitado durante 15 minutos a 60Hz a 4°C , y se colocaron en el tubo rotulado como 10 EU/mL, el cual se agitó durante 1 minuto a las condiciones antes mencionadas. Posteriormente, a partir del tubo de 10 EU/mL se hicieron diluciones seriadas para lo cual se tomaron 100 μL de esta disolución y se transfirieron al tubo rotulado como 1.0 EU/mL y así sucesivamente hasta el tubo de

0.01 EU/mL. Se colocaron por triplicado 100 μ L del estándar y de cada dilución en una placa de 96 pozos de fondo plano libre de pirógenos y de baja adherencia. Igualmente, se adicionó por triplicado 100 μ L de medio RPMI y 100 μ L de una dilución de Hsp70 en agua LAL a una concentración de 1.65 μ g/mL (esta cantidad corresponde a un tercio de la cantidad utilizada para estimular las CMHSP por lo que la cantidad de LPS obtenida tendrá que multiplicarse por tres para saber la cantidad de LPS que acarrea el estímulo). Se colocó la placa en el lector de placas modelo Lx808 (Lonza) incubándose a 37 °C por 10 minutos según lo programado. A cada pozo se le adicionó 100 μ L del Lisado de amebocitos del Limulus y se corrió la prueba utilizando el software WIN KQCL versión 4.0 para su análisis posterior.

Una vez conocida la cantidad de LPS contenida en la muestra de Hsp70 se procedió a evaluar si estas trazas son capaces de activar a las CMHSP a nivel de activación de NF- κ B y de inducción de TNF- α . Con este fin, se estimularon 1×10^6 CMHSP con concentraciones crecientes de LPS en un rango entre 0.1 ng a 50 ng en una cinética de 5 puntos. Transcurridos los tiempos de estimulación se procedió a tomar los sobrenadantes y los extractos nucleares de cada estímulo y se determinó la presencia de TNF- α y la activación de NF- κ B mediante las técnicas de ELISA y EMSA, respectivamente.

8.3 Determinación de la activación de CMHSP a nivel de secreción de TNF- α por medio de la técnica de ELISA.

Se sensibilizó una placa de 96 pozos para inmunoensayo con anticuerpos de captura anti-TNF- α (diluido 1:250 en solución de carbonatos, pH=9.5) según las especificaciones del proveedor y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se lavó la placa tres veces, sin golpearla, con 200 μ L de solución de lavado (Tween-20 en PBS al 0.05%). Posteriormente, se bloqueó con 200 μ L de solución bloqueadora (SFB en PBS al 10%) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 3 horas. Se lavó la placa tres veces con solución de lavado y se añadió por duplicado en las primeras dos filas 100 μ L de un estándar de TNF- α a la concentración de 500, 250, 125, 62.5, 31.25,

15.6 y 7.8 pg/mL para lo cual se hicieron diluciones seriadas (1:2) utilizando solución de bloqueo. En los pozos restantes se colocó por duplicado 100 μ L de las muestras (sobrenadantes) provenientes de la estimulación de las CMHSP y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado y se añadió a cada pozo 100 μ L de una mezcla de anticuerpo de detección anti-TNF α (biotinilado) y estreptavidina (ambos con una dilución 1:250 en solución de bloqueo) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante una hora para posteriormente lavar la placa 7 veces con solución de lavado y un último lavado con PBS. Se reveló con 100 μ L de solución reveladora (0.05% de OPD y 0.09% de H₂O₂ en solución de citratos, pH = 5.6) incubando en oscuridad por 15 minutos. La reacción se detuvo agregando 10 μ L de H₂SO₄ 2.5 N a cada pozo. La placa fue leída en un lector de microplacas a 490 nm. Se determinó la concentración de TNF- α para cada muestra interpolando su absorbancia en la curva estándar. Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows.

8.4 Evaluación de la participación de los receptores TLR-2 y TLR-4 en el reconocimiento de Hsp70 extracelular. Obtención de sobrenadantes y extractos nucleares de CMHSP estimuladas con Hsp70, LPS y PG.

Existen publicaciones en las que se propone que Hsp70 puede activar al factor transcripcional NF- κ B en un mecanismo dependiente de los receptores tipo Toll. Para evaluar si los receptores TLR-2 y TLR-4 están involucrados en el reconocimiento de Hsp70, se estimularon CMHSP con Hsp70 en presencia y ausencia de anticuerpos bloqueadores anti-TLR-2 y anti-TLR-4 y se evaluó la activación de NF- κ B.

Antes de realizar este experimento se comprobó que los anticuerpos cumplían eficazmente con su función bloqueadora para lo cual se estimularon CMHSP con peptidoglicana (PG) y lipopolisacárido (LPS) (ligandos reconocidos para TLR-2 y TLR-4, respectivamente) en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueadores. La metodología empleada se describe a continuación.

Transcurridas las 24 horas de incubación de las CMHSP se les cambió el medio de cultivo y se les colocó 400 μL de medio RPMI limpio. Inmediatamente después se les colocó 300 μL de una dilución de anticuerpos bloqueadores o 300 μL de medio RPMI limpio y se dejó incubar durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 300 μL del estímulo correspondiente a Hsp70, LPS y PG y se dejó incubar durante 15, 30, 60 y 120 minutos a 37 °C y 5% de CO_2 . Cumplido el tiempo de incubación se recolectó el sobrenadante de cada pozo y se colocó por duplicado en tubos Eppendorf de 0.6 mL y se almacenó a -70 °C hasta su análisis por ELISA. Una vez retirado el sobrenadante, se añadió a cada pozo 600 μL de solución hipotónica fría (ver anexo 1) y, con ayuda de un raspador de plástico, se despegaron las células de los pozos. Se tomó la solución hipotónica donde nadaban las células y se colocó en tubos Eppendorf de 1.7 mL y se dejó incubar durante 10 minutos en hielo para después agregarles 10 μL de IGEPAL al 10% y se agitaron durante 5 minutos en un rotador de tubos a 4 °C y después se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo de centrifugación, se desechó el sobrenadante de cada tubo (fracción citoplasmática) y se homogenizó el botón en 600 μL de solución hipotónica para volver a centrifugar a las mismas condiciones. Inmediatamente después se resuspendió el botón en 20 μL de solución hipertónica (ver anexo 1) y se agitó durante 5 minutos en el rotador de tubos a 4°C para posteriormente centrifugar a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se tomó el sobrenadante de cada tubo (fracción nuclear) y se almacenó a -70°C hasta su análisis por EMSA.

A continuación se muestran las sustancias y las respectivas concentraciones que se utilizaron para llevar a cabo la estimulación.

A partir de una alícuota de LPS $5 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}$, de PG $200 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$, de Hsp70 $1.65 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$, de anticuerpo bloqueador anti-TLR-2 $0.5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ y de anticuerpo bloqueador anti-TLR-4 $1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ se prepararon las siguientes diluciones para la estimulación:

- 10.5 μL LPS + 304.5 μL RPMI-----Cada 300 μL de la mezcla contiene 50 ng de LPS.

- 51.67 µL PG + 258.33 µL RPMI-----Cada 300 µL de la mezcla contiene 10 µg de PG
- 3.13 µL Hsp70 + 306.87 µL RPMI-----Cada 300 µL de la mezcla contiene 5 µg de Hsp70
- 20.67 µL anti-TLR-2 + 289.33 µL RPMI-----Cada 300 µL de la mezcla contiene 10 µg de anti-TLR-2
- 51.5 µL anti-TLR-4 + 258.5 µL RPMI-----Cada 300 µL de la mezcla contiene 50 µg de anti-TLR-4
- 20.67 µL anti-TLR-2 + 51.5 µL anti-TLR4 + 237.83 µL RPMI-----Cada 300 µL de la mezcla contiene 10 µg de iTLR-2 y 50 µg de iTLR-4

8.5 Hidratación, hibridación y marcaje radioactivo del oligonucleótido correspondiente a la secuencia consenso para el NF-κB

Para detectar la activación de NF-κB mediante el ensayo del retardo de la movilidad electroforética (EMSA) se mandó a sintetizar un oligonucleótido de DNA correspondiente a la secuencia consenso reportada para el factor transcripcional NF-κB humano, cuya sucesión de nucleótidos (para la cadena sentido) fue:

5' – AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC – 3'

Se nos entregó el oligonucleótido liofilizado en dos viales, cada uno conteniendo a la sentido y a la cadena antisentido correspondientemente. Se hidrató cada vial con el volumen necesario de agua desionizada a fin de que en ambos tuvieran la misma concentración molar (equimolaridad). Posteriormente, se tomaron y mezclaron volúmenes iguales de cada vial y esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 90 °C para después dejar enfriar lentamente hasta llegar a temperatura ambiente a fin de que se lleve a cabo la hibridación de las hebras de DNA. Para comprobar que la hibridación se llevó a cabo eficientemente se corrió una muestra en gel de agarosa al 2% (60 volts) y se reveló con bromuro de etidio. Este oligonucleótido de doble cadena corresponde a la sonda fría.

Para marcar la sonda, se tomó el volumen necesario del oligonucleótido de NF-κB previamente hibridado y se diluyó con agua a fin de obtener una concentración entre el intervalo de 1-20 pmol/μL. Esta solución se marcó con fosfato radioactivo, [γ - 32 P]-ATP, siguiendo las especificaciones del proveedor del kit de la T4-polinucleotidilcinasa y siguiendo las medidas de seguridad necesarias para la manipulación de radiación. Los oligonucleótidos se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Para el almacenamiento de los oligonucleótidos marcados radioactivamente se utilizó un recipiente de plomo a fin de evitar la fuga de radiación.

Para evaluar la especificidad con que el oligonucleótido es reconocido, se utilizó el mismo oligonucleótido antes mencionado pero sin marcaje radioactivo, lo cual corresponde a la sonda fría o de competencia. Como sonda irrelevante se utilizó la sonda correspondiente al oligonucleótido de HSE el cual no interacciona con NF-κB cuya secuencia de nucleótidos (para la cadena sentido) fue:

5'–CCCCTGGAATATTCCCGACC–3'

8.6 Determinación del nivel de activación del factor de transcripción NF-κB en las fracciones nucleares de las CMHSP por EMSA.

La técnica de EMSA nos permite observar la interacción de una proteína (factor transcripcional) con una secuencia conocida de ADN, correspondiente a la secuencia consenso para el factor transcripcional de nuestro interés.

Para realizar la técnica de EMSA se preparó un gel de poliacrilamida al 6% con capacidad para 15 carriles y se colocó en una cámara electroforética y se le adicionó buffer TBE al 0.5X dentro y fuera de los vidrios que contienen al gel y se conectó a 0.28 mA por 30 minutos antes de colocar las muestras, a fin de limpiar y alinear los carriles del gel. Mientras tanto, se rotularon 13 tubos Eppendorf de 0.6 mL y se colocaron en hielo. A cada tubo se le agregó 4 μL de espermidina (4 mM), 4 μL de MgCl₂ (4mM), 5 μL de BDG 1X y 1 μL de poli (d:i-d:c) (1μg/μL). A los tubos 1-11 se les adicionó 4 μL del extracto nuclear correspondiente a cada estímulo y 2 μL de

agua para llevar a un volumen final de 20 μL . A los tubos 12 y 13 se les adicionaron 4 μL del extracto nuclear correspondiente al estímulo con LPS (pozo 11) y además se agregó 1.5 μL de sonda fría (oligonucleótido de NF- κB hibridado sin marcar) para el tubo 12 y 0.5 μL de sonda irrelevante (oligonucleótido de HSE hibridado y no marcado) al tubo 13. Ambos tubos se llevaron a un volumen final de 20 μL con agua. Se homogenizó el contenido de cada tubo y se centrifugó por 10 segundos para concentrar lo que se encontraba en las paredes y se incubó en hielo por 15 minutos. A cada tubo se le adicionó 1 μL del oligonucleótido de NF- κB marcado con [γ - ^{32}P]-ATP y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

En el primer carril del gel de poliacrilamida se adicionó 15 μL de azul de bromofenol 4X (ver anexo 1) para indicar el frente de corrimiento. En los carriles restantes se colocaron las muestras y se dejó correr el ensayo a 0.28 mA durante el tiempo necesario hasta que el frente de corrimiento llegara al final del gel. Posteriormente el gel se retiró de los cristales y se secó en papel filtro a 80°C por 60 minutos en un secador de geles (Biosciences). Transcurrido el tiempo de secado, se colocó el gel en un casete (marca Kodak) para ser expuesto frente a películas sensibles a la radiación, todo esto en un cuarto oscuro. El tiempo de exposición estuvo en función de la intensidad radioactiva de la sonda marcada con [γ - ^{32}P]-ATP (entre más vidas medias haya cumplido el fosforo radioactivo, más tiempo de exposición fue necesario). Por último, la película se reveló y fijó utilizando solución reveladora y fijadora para fotografías, marca Kodak.

9. RESULTADOS

La estimulación de CMHSP con Hsp70 baja en endotoxina no induce la secreción de TNF- α

Una parte fundamental en la realización de este trabajo de investigación consiste en tener la certeza de que los resultados observados tras la estimulación con Hsp70 serán inherentes a esta proteína y no a contaminación con LPS. Por esta razón, se adquirió una proteína recombinante humana baja en endotoxina lo cual fue corroborado mediante la realización del ensayo del lisado de amebocitos del *Límulus* cromogénico. El proveedor con quien se adquirió la proteína reporta que cada 5 μg de Hsp70 acarrea una contaminación menor a 20 pg de LPS. En la *Figura 1a* se muestran las unidades de endotoxina (EU) presentes en una muestra de Hsp70, en una muestra de medio de cultivo RPMI 1640 y en una muestra de agua libre de pirógenos (control negativo). Los resultados indican que el medio RPMI, al igual que el agua LAL, contiene una cantidad de LPS por debajo del límite de detección de la técnica (menos de 0.01 EU/mL, lo que corresponde a menos de 1 pg de LPS/mL); por su parte, la muestra de Hsp70 acarrea una contaminación de 0.0751 EU/mL (alrededor de 6.3 pg de LPS por cada 1.65 μg de proteína) que equivale aproximadamente a 18.9 pg de LPS por cada 5 μg de Hsp70. Por lo tanto, la cantidad de LPS presente en la muestra de Hsp70 cumple con las especificaciones reportadas por el proveedor.

En diversos artículos se ha documentado que Hsp70 es una molécula con actividad pro-inflamatoria, capaz de provocar la secreción de citocinas del tipo de TNF- α aunque en otros reportes se atribuye esta capacidad a la contaminación de la proteína con LPS. Se decidió evaluar si Hsp70 baja en endotoxina genera la liberación de TNF- α . En la *Figura 1b* se muestra que CMHSP que no recibieron estímulo alguno no secretaron TNF- α a ninguno de los tiempos estudiados (control negativo), mientras que la estimulación con LPS, un potente inductor de la respuesta inflamatoria, provocó la liberación de altos niveles de TNF- α incluso desde tiempos tempranos (control positivo). La estimulación con la muestra de Hsp70 baja en endotoxina tampoco generó la producción de TNF- α en ningún tiempo.

a)

Samples	Lot No.	RESULTS (EU)
Sample 1		
HSP 70	00003458	0.0751
Sample 2		
RPMI	837542	<0.0100
Sample 3		
AGUA LAL	00000176060	<0.0100

b)

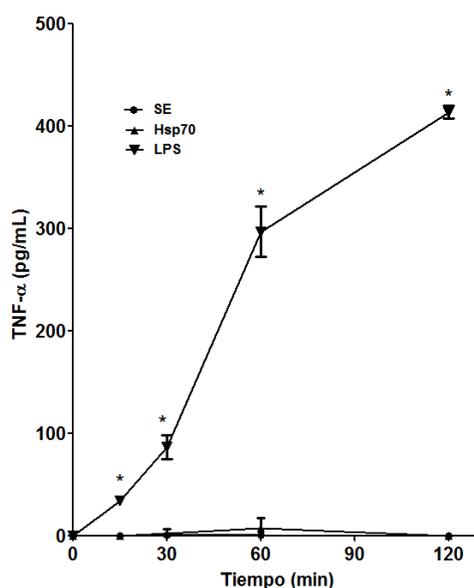


Figura 1. La estimulación con Hsp70 baja en endotoxina no genera la secreción de TNF- α en CMHSP.

a) Se determinó la cantidad de endotoxina presente en la preparación de Hsp70 y en el medio de cultivo RPMI a fin de comprobar los niveles reportados por el proveedor. Se cuantificó por triplicado la cantidad de endotoxina contenida en una muestra de 1.65 μ g de Hsp70 (rectángulo rojo), en una muestra de medio de cultivo RPMI (rectángulo amarillo) y en agua libre de pirógenos (rectángulo verde). Límite de detección de la prueba: 0.0100 EU/mL. b) Para evaluar si Hsp70 baja en endotoxina es capaz de inducir la liberación de TNF- α se estimuló un millón de CMHSP durante 15, 30, 60 y 120 minutos con 5 μ g de Hsp70 o con 50 ng de LPS. Después del tiempo de incubación, se obtuvieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF- α mediante ELISA. Como control negativo (SE) se utilizaron células que no recibieron estímulo alguno. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes. Prueba ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Bonferroni. Significancia: * $p < 0.001$ con respecto al SE.

La presencia de Hsp70 en el medio extracelular regula negativamente la secreción de TNF- α en mononucleares humanos estimulados con LPS

La actividad pro-inflamatoria de Hsp70 parte de reportes en los que se encuentra que la proteína puede liberarse de células a partir de necrosis celular secundaria a infecciones por bacterias Gram negativas que contienen LPS a fin de inducir una respuesta inflamatoria y acabar con la infección. Esta actividad pro-inflamatoria fue puesta en duda al encontrar que el responsable de los efectos inflamatorios era el LPS y no Hsp70 *per se*. Estudios posteriores muestran que la liberación de Hsp70, por efecto de un proceso inflamatorio o infeccioso, regula negativamente la respuesta proinflamatoria. Por lo anterior, decidimos evaluar el papel que tiene Hsp70 en el medio extracelular durante la estimulación de mononucleares de voluntarios sanos con LPS, uno de los principales componentes de bacterias Gram negativas. Para tal efecto, se estimularon CMHSP con Hsp70, LPS o con LPS en presencia de Hsp70, durante una cinética de cinco tiempos, y se determinó la secreción de TNF- α por ensayo de ELISA. Como se muestra en la *Figura 2*, la estimulación de CMHSP con Hsp70 no induce la secreción de TNF- α ; sin embargo, la estimulación de las células con LPS en presencia de Hsp70 provocó una menor secreción de TNF- α durante todos los tiempos, en comparación con células que fueron estimuladas únicamente con LPS.

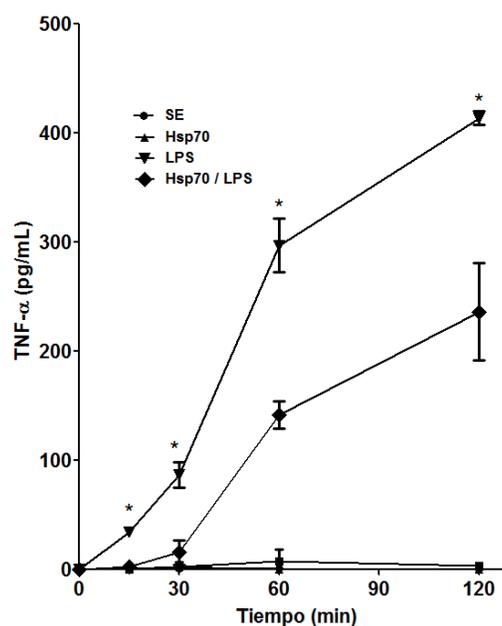


Figura 2. Hsp70 regula a la baja la secreción de TNF- α en CMHSP estimuladas con LPS. Un millón de CMHSP fueron incubadas durante 15, 30, 60 y 120 minutos con 5 μ g de Hsp70, 50 ng de LPS o con una mezcla de ambas moléculas (Hsp70/LPS). Posterior al tiempo de incubación, se obtuvieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF- α mediante ELISA. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes. Prueba ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Bonferroni. Significancia: * p <0.001 con respecto a Hsp70.

La estimulación con Hsp70 induce la activación de NF- κ B.

La activación de NF- κ B inducido por Hsp70 es polémica. Existen reportes que señalan que en el espacio extracelular Hsp70 es capaz de activar este factor transcripcional, pero, en oposición, también se ha documentado que Hsp70 regula a la baja su activación y que por sí misma no es capaz de activarlo. Para identificar cuál de estas dos opciones se presenta en nuestro modelo, se realizó una cinética de activación de NF- κ B inducida por Hsp70 (Figura 3). Los resultados indican que la estimulación con 25 ng de LPS (control positivo) genera la activación de NF- κ B en una forma tiempo dependiente, observándose una elevada interacción entre el factor transcripcional y el oligonucleótido a los 60 y 120 minutos. Por su parte, la estimulación con Hsp70 también indujo la activación de NF- κ B a los 15 y 120 minutos, mientras que a los 30 y 60 minutos prácticamente no hay NF- κ B activo en el núcleo celular.

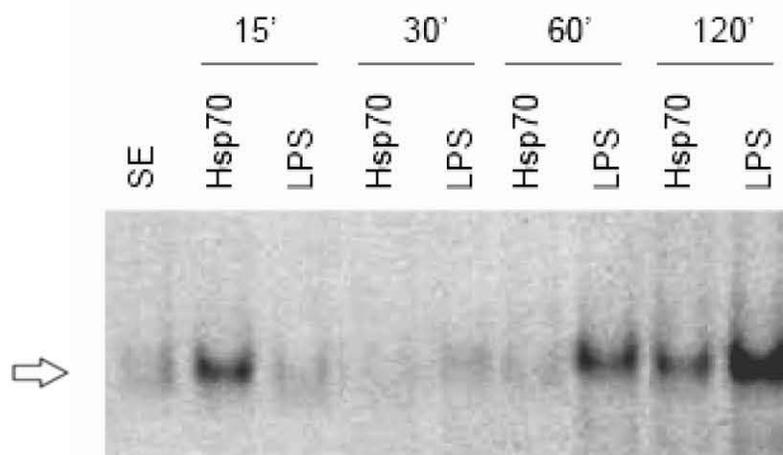


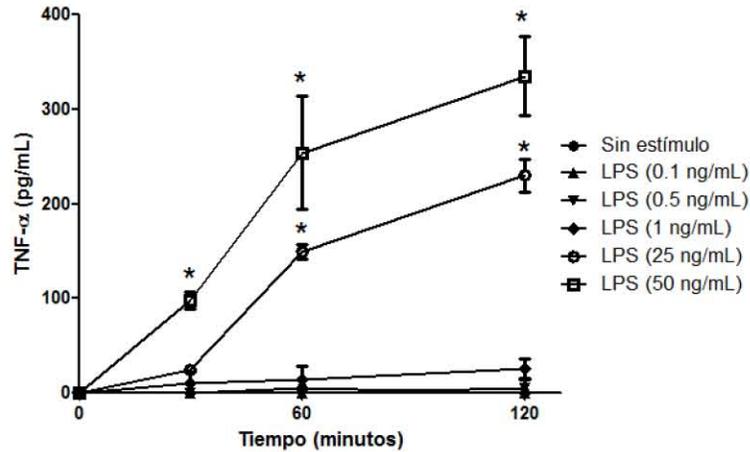
Figura 3. Hsp70 induce la activación de NF- κ B. Se estimuló un millón de CMHSP con 5 μ g de Hsp70 y con 25 ng de LPS (control positivo) durante 15, 30, 60 y 120 minutos y posteriormente se obtuvieron

extractos nucleares en los que se determinó la activación de NF- κ B por EMSA. El complejo NF- κ B – ADN se indica mediante una flecha abierta. Células que no fueron estimuladas se utilizaron como control negativo. La autoradiografía es representativa de 2 experimentos independientes.

La concentración de LPS presente en Hsp70 no es suficiente para observar una respuesta a nivel de secreción de TNF- α y en la activación de NF- κ B en CMHSP.

A pesar de que la cantidad de LPS contenida en el vial de proteína Hsp70 no fue suficiente para inducir la secreción de TNF- α (*Figura 1*), existe la posibilidad de que sí induzca la activación del factor transcripcional NF- κ B, pues se ha reportado que el reconocimiento de LPS mediado por TLR-4 y la subsecuente activación de NF- κ B, es de alta sensibilidad. Por esta razón, nos cuestionamos si la cantidad de LPS presente en la muestra de Hsp70 es suficiente para inducir la activación de NF- κ B en CMHSP, a pesar de no ser suficiente para inducir la liberación de TNF- α . Para evaluar esta posibilidad se estimularon CMHSP con concentraciones crecientes de LPS (de 0.1 pg a 50 ng) y se determinó la activación celular a nivel de secreción de TNF- α (mediante ELISA) y a nivel de activación de NF- κ B (mediante EMSA). Los resultados indican que se requieren más de 0.5 ng de LPS para empezar a observar la secreción de TNF- α y más de 1 ng para que la producción sea significativamente diferente con respecto a células que no recibieron estímulo (*Figura 4a*). Por otra parte, se requieren más de 0.1 ng de LPS para generar la activación de NF- κ B (*Figura 4b*). La cantidad de LPS acarreado por la estimulación con Hsp70 (18.9 pg = 0.0189 ng) está por debajo de la cantidad mínima necesaria para observar activación celular tanto a nivel de secreción de TNF- α como a nivel de activación de NF- κ B por lo que se puede afirmar que la cantidad de LPS contenida en la muestra de Hsp70 es muy baja como para interferir en los resultados medidos para la estimulación con Hsp70.

a)



b)

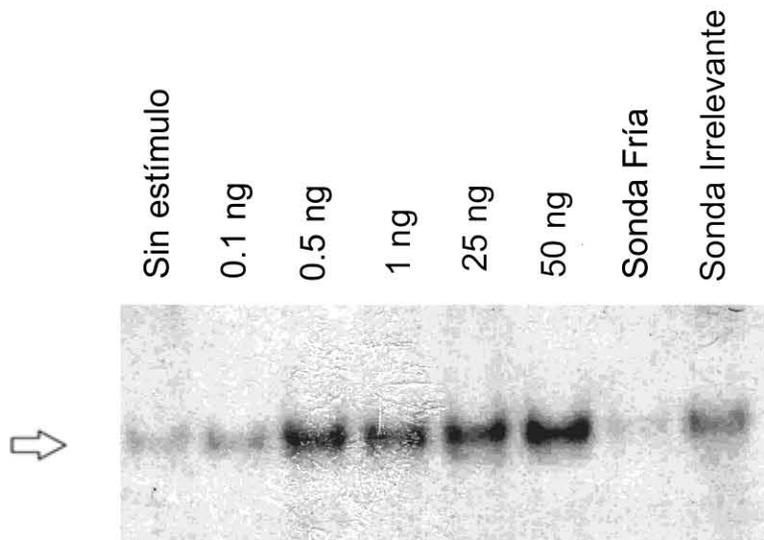


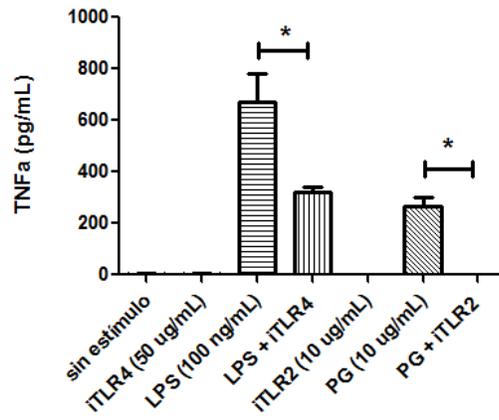
Figura 4. La cantidad de endotoxina presente en la preparación de Hsp70 no es suficiente para observar una respuesta celular a nivel de secreción de TNF- α ni de activación de NF- κ B. Se estimuló un millón de CMHSP con cantidades crecientes de LPS en un intervalo entre 0.1 ng a 50 ng durante 15, 30, 60, y 120 minutos. **a)** Se cuantificó la concentración de TNF- α en sobrenadantes mediante ELISA y **b)** la activación del factor transcripcional mediante EMSA. Células que no recibieron estímulo se usaron como control negativo. El complejo NF- κ B – ADN se indica mediante una flecha abierta. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes y la autoradiografía es representativa de dos experimentos. Prueba ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Bonferroni. Significancia: *p<0.001 con respecto al sin estímulo.

TLR-2 y TLR-4 están involucrados en el reconocimiento de Hsp70 extracelular

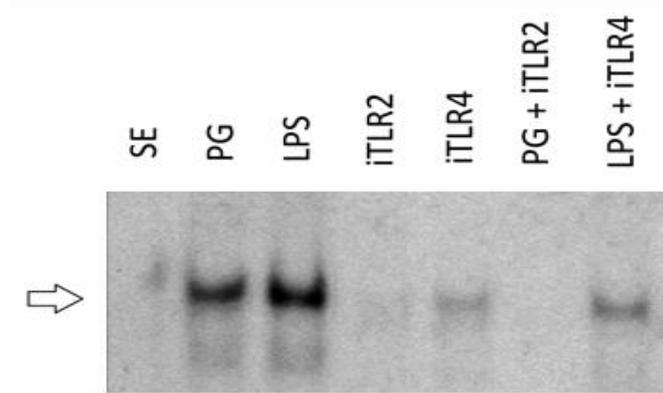
La idea de que Hsp70 puede modular la inmunidad innata mediante la producción de citocinas como el TNF- α , proviene de estudios que analizan la interacción de la proteína con receptores presentes en la membrana celular de células presentadoras de antígeno como las células dendríticas y los monocitos. Dentro de los receptores propuestos se encuentran TLR-2 y TLR-4, este último, receptor reconocido del LPS. Nos preguntamos si Hsp70 puede ser reconocida a través de estos receptores. Para responder esta pregunta utilizamos anticuerpos bloqueadores anti-TLR-2 y anti-TLR-4, de los cuales evaluamos su capacidad para inhibir la activación de NF- κ B y la secreción de TNF- α en CMHSP que fueron estimuladas durante 120 minutos con ligandos correspondientes, PG y LPS respectivamente. Después del tiempo de incubación, se obtuvieron los sobrenadantes y extractos nucleares propios a cada estímulo y se cuantificó la secreción de TNF- α (*Figura 5a*) y la activación del NF- κ B (*Figura 5b*). La estimulación con los ligandos de TLRs en células que fueron pre-incubadas con los anticuerpos bloqueadores presentan una menor activación del NF- κ B y una menor secreción de TNF- α en comparación con células que no fueron pre-incubadas con los anticuerpos bloqueadores. Esto nos indica que los anticuerpos están cumpliendo de manera efectiva con su actividad bloqueadora al impedir la interacción ligando-receptor lo cual se manifiesta como una reducción en la activación celular inducida por ligandos de TLR-2 y TLR-4.

Una vez que se tuvo la certeza de que los anticuerpos estaban funcionando correctamente, se procedió a estimular durante 120 minutos CMHSP con Hsp70 en presencia de iTLR-2 y/o iTLR-4. A continuación se obtuvieron las fracciones nucleares para cada grupo de estudio y se realizó un EMSA a fin de observar cambios en la activación del NF- κ B (*Figura 5c*). La activación de NF- κ B inducida por Hsp70 disminuyó considerablemente en células incubadas previamente con alguno de los anticuerpos. La activación de NF- κ B se inhibe por completo en células incubadas en presencia de ambos anticuerpos.

a)



b)



c)

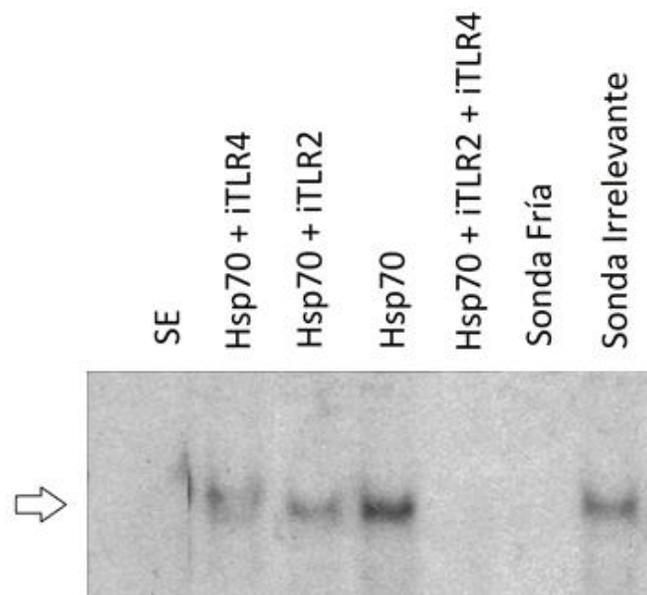


Figura 5. TLR-2 y TLR-4 están involucrados en el reconocimiento extracelular de Hsp70. Un millón de CMHSP fueron incubadas durante 60 minutos en presencia de iTLR-2 (10 µg) e iTLR-4 (50 µg). Posteriormente, las células se estimularon durante 120 minutos con 10 µg de peptidoglicana (PG) o con 100 ng de lipopolisacárido (LPS) para después, **a)** cuantificar la cantidad de TNF-α secretada al sobrenadante mediante ELISA y **b)** evaluar la activación de NF-κB mediante EMSA. **c)** un millón de CMHSP se estimularon durante 120 minutos con 5µg de Hsp70 en presencia o ausencia de iTLR-2 y/o iTLR-4 y se determinó la activación de NF-κB en los extractos nucleares. La autoradiografía es representativa de 2 experimentos independientes. La flecha abierta indica el complejo NF-κB – ADN. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes. Prueba ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Bonferroni. Significancia: $p < 0.001$.

10. DISCUSIÓN

En la última década se ha incrementado de manera considerable el conocimiento sobre las proteínas del choque térmico y estos avances han cambiado el paradigma con respecto a sus funciones inmunológicas, en el contexto de su capacidad para inducir una respuesta inflamatoria cuando son liberadas al espacio extracelular. Se ha propuesto que la liberación activa o pasiva de Hsp70 tiene como consecuencia el inicio de una respuesta inflamatoria a través de su reconocimiento por receptores de la inmunidad innata, como los TLRs, con la subsecuente expresión genética de mediadores inflamatorios del tipo del TNF- α , en un mecanismo regulado por factores de transcripción como el NF- κ B (Asea, Rehli et al. 2002). En oposición, diversos reportes sostienen que la capacidad de Hsp70 para inducir la activación del sistema inmunológico se debe a su contaminación con componentes bacterianos, como el LPS (Gao and Tsan 2003).

De acuerdo a lo anterior, el primer paso que realizamos con el fin de contestar nuestra pregunta de investigación, fue analizar la concentración de LPS en el vial de Hsp70, ya que persiste la duda en relación a la capacidad inmunoreguladora de Hsp70 por la presencia de LPS. Como se muestra en la *Figura 1a*, la cantidad de endotoxina en el vial de Hsp70 es de 18.9 pg de LPS por cada 5 μ g de Hsp70, que fue la concentración que utilizamos para la estimulación de las células en todos los experimentos. Esta concentración es muy baja por lo que nos otorga la confianza de que los resultados que mostramos están en relación a la proteína y no a la cantidad de LPS que acarrea el estímulo. En adición a este resultado, en la *Figura 1b* se muestra que la estimulación de CMHSP con Hsp70 no induce la secreción de TNF- α . Estos resultados confirman que Hsp70 no presenta la capacidad de inducir inflamación, lo que concuerda con lo reportado por Bausinger y colaboradores quienes observaron que Hsp70 contaminada con LPS es capaz de inducir una fuerte respuesta inflamatoria caracterizada por la secreción de mediadores inflamatorios del tipo de TNF y la activación de células presentadoras de antígenos, sin embargo, cuando se retira este compuesto bacteriano mediante polimixina B, Hsp70 es incapaz de provocar estas respuestas (Bausinger, Lipsker et al. 2002). Igualmente,

con la finalidad de descartar que el medio de cultivo RPMI 1640 estuviera contaminado con trazas de LPS y estas pudieran interferir con los resultados obtenidos, se determinó por medio de *Límulus* la cantidad de LPS y se obtuvo que la cantidad es tan baja que incluso queda fuera del límite de detección de esta prueba, por lo que descartamos que el RPMI 1640 tenga alguna posible participación en la activación celular.

Las infecciones por bacterias Gram negativas pueden inducir necrosis celular, transcripción genética de Hsp70 y su subsecuente liberación al medio extracelular. Igualmente, durante los procesos infecciosos las moléculas bacterianas (PAMPs) inducen una respuesta inflamatoria cuando son reconocidas por receptores de tipo PRR, como los TLRs. Hsp70 en el medio intracelular tiene un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria al interferir en la cascada de señalización de la vía de NF- κ B (Chen, Wu et al. 2006; Luo, Zuo et al. 2008; Yao, Zhang et al. 2011). Por lo anterior nos preguntamos acerca del papel de Hsp70 en el medio extracelular, concretamente en la generación de la respuesta inflamatoria en células estimuladas con LPS. Los resultados de la *Figura 2* muestran que la estimulación con LPS en presencia de Hsp70, induce la liberación de TNF- α en una cantidad significativamente menor con respecto a células estimuladas únicamente con LPS ($P < 0.001$ LPS vs LPS/Hsp70). Esto nos habla de que Hsp70 tiene la capacidad para regular la respuesta inflamatoria a expensas de la disminución de la secreción de TNF- α inducida por LPS. Este resultado concuerda con otros reportes en donde se ha observado que Hsp70 extracelular es capaz de modificar la habilidad de ciertos PAMPs para activar la respuesta inmune innata disminuyendo la producción de TNF- α y de la síntesis de RNA mensajero (Ferat, E; Tesis de doctorado, UNAM)(Luo, Zuo et al. 2008).

Se ha propuesto que Hsp70 puede regular la secreción de mediadores inflamatorios a través de la regulación en la activación de NF- κ B (Shi, Tu et al. 2006). Por lo tanto, nos cuestionamos si nuestra Hsp70 baja en endotoxina es capaz de activar a este factor transcripcional. En la *Figura 3* se muestra que Hsp70 es capaz de inducir la activación de NF- κ B. Sin embargo, existe la posibilidad de que las trazas de LPS

presentes en Hsp70 puedan ser las responsables de la activación de este factor, a pesar de no ser suficientes para inducir la secreción de TNF- α . Los resultados de la *Figura 4* descartan que la cantidad de LPS presente en el vial de Hsp70 sean suficientes para provocar la secreción de TNF- α y la activación de NF- κ B, por lo que podemos decir con certeza que la activación de este factor observada en la *Figura 3* es inherente a la estimulación con Hsp70 y no al LPS que contiene. Estos resultados parecen indicar que Hsp70 señala a través de la vía del NF- κ B. Nuestros resultados concuerdan con varios reportes en donde se muestra que Hsp70 extracelular induce la activación de NF- κ B (Wheeler, Chase et al. 2009; Fang, Wu et al. 2011).

Se ha reportado que Hsp70 puede interaccionar con la membrana celular de células presentadoras de antígenos, lo que sugiere la existencia de receptores de membrana para esta proteína (Srivastava, Udonon et al. 1994). Se sabe que los receptores tipo Toll son importantes en el reconocimiento de moléculas bacterianas como el LPS (bacterias Gram negativas) y la peptidoglicana (bacterias Gram positivas) y que el factor transcripcional NF- κ B es un punto central en la vía de señalización. Por lo tanto, nos propusimos evaluar si TLR-2 y TLR-4 están implicados en el reconocimiento de Hsp70 y si esta interacción es la responsable de la activación del NF- κ B. La estimulación de células mononucleares con Hsp70 en presencia de alguno de los anticuerpos bloqueadores, trajo como consecuencia la disminución en la activación de NF- κ B inducida por esta proteína en comparación con células que no fueron incubadas previamente con los anticuerpos (*Figura 5c*). El bloqueo simultáneo de ambos receptores inhibió por completo la activación de NF- κ B inducida por la Hsp70, lo cual sugiere que TLR-2 y TLR-4 pueden estar involucrados en el reconocimiento de Hsp70. A pesar de existir controversia, diversos autores han publicado la participación de los receptores tipo Toll en el reconocimiento de Hsp70 extracelular (Asea, Rehli et al. 2002; Wheeler, Chase et al. 2009; Fang, Wu et al. 2011; Borges, Wieten et al. 2012). La información presentada en este trabajo apoya la teoría de que Hsp70 puede ser ligando de TLR-2 y TLR-4 y que esta interacción conlleva a la activación del factor transcripcional NF- κ B. El mecanismo a través del cual Hsp70 reduce la capacidad de ciertos PAMPs de inducir la activación celular, puede explicarse por la interacción que tiene Hsp70 con su receptor de membrana y

la activación secundaria de una cascada de señalización que favorece la regulación negativa de la síntesis y la liberación de mediadores inflamatorios. Posiblemente Hsp70 está activando al dímero p50/p50 de NF- κ B, pues se sabe que la activación de este homodímero inhibe la transcripción genética por competencia estérica con el heterodímero p50/p65 (May and Ghosh 1997). La activación de p50/p50 explicaría la disminución en la producción de TNF- α a nivel de RNA mensajero y a nivel de proteína.

Hay reportes previos en los que se observa que Hsp70 puede interactuar físicamente con otros receptores como es el caso del receptor Scavenger SREC-1 y que esta interacción conlleva a la activación de NF- κ B probablemente por co-localización y cooperación con TLR-2 (Jeannin, Bottazzi et al. 2005). También se ha reportado que la capacidad de Hsp70 de inducir la activación de células T se inhibe cuando se inhabilita TLR-2, TLR-4 o SREC-1, lo cual nos habla de la participación de estos receptores en el reconocimiento extracelular de Hsp70 (Gong, Zhu et al. 2009).

La acción inmunoreguladora de Hsp70 ha sido demostrada en múltiples modelos animales y humanos por lo que es atractivo especular que la inducción en la síntesis de Hsp70 puede servir como terapia, pero para que esto sea posible primeramente tendremos que entender mejor los mecanismos moleculares por medio de los que actúa esta molécula, siendo que aún queda una gran cantidad de preguntas que resolver antes de maximizar el uso de Hsp70 como agente terapéutico.

11. CONCLUSIÓN

La evidencia experimental mostrada en el presente trabajo de investigación apoya la teoría de que Hsp70 es una molécula que en el espacio extracelular posee actividad anti-inflamatoria al regular negativamente la secreción de TNF- α inducida por LPS, en un modelo de CMHSP. Además, Hsp70 provoca la activación del factor transcripcional NF- κ B, en un mecanismo dependiente de receptores tipo Toll, TLR-2 y TLR-4.

ANEXO

Reactivos utilizados

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se prepara en un frasco de vidrio despirogenizado. Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C.

NaCl	8g
Na ₂ HPO ₄	1.16 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g

Aforar a 1000 ml con agua inyectable o MiliQ. El pH, sin ajustar, debe ser de 7.2 a 7.4.
Esterilizar en autoclave.

Medio RPMI suplementado. Se prepara en un frasco de vidrio despirogenizado o en la misma botella de plástico del RPMI 1640. Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C.

L-Glutamina	500 µL
Piruvato de sodio	500 µL
Penicilina/estreptomicina	1000 µL
Suero fetal bovino	50 µL

Aforar a 50 mL con RPMI 1640. Con este procedimiento, el RPMI queda suplementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina G 100 U/ml y sulfato de estreptomicina 100 µg/ml y 0.1 % de suero fetal bovino.

Solución reguladora de carbonatos 0.1 M, pH 9.5. Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C.

NaHCO ₃	0.840 g
Na ₂ CO ₃	0.356 g
Aforar a 100 ml con agua destilada	
Ajustar el pH con HCl 1N o NaOH 1N según se requiera	

Solución de bloqueo. Preparar al momento

PBS	90 ml
Suero fetal bovino	10 ml

El pH, sin ajustar, debe ser muy cercano a 7.0; en caso contrario el suero podría estar contaminado y no se debe utilizar.

Solución de lavado. Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C.

PBS	800 ml
Tween 20	400 µl

Solución reguladora de citratos pH 5.6. Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

Ácido cítrico	4.1 g
Citrato de sodio	29 g
Aforar a 1000 ml con agua destilada	
Ajustar el pH con HCl 1N o NaOH 1N según se requiera	

Solución reveladora de ortofenilén diamina (OPD). Preparar al momento

OPD	0.012 g
-----	---------

Solución reguladora de citratos	24 ml
H ₂ O ₂ 30%	20 µl

Solución de paro. Se puede preparar por anticipado y almacenar a temperatura ambiente

H ₂ SO ₄	6.7 ml
Aforar a 100 ml con agua destilada	

Mezcla para la preparación del gel de poliacrilamida al 6%. Preparar al momento

Acrilamida 30%	18mL
Buffer TBE 10x	4.5mL
Agua	67.5mL
APS al 10%	378uL
TEMED	126uL
Esta mezcla es para 2 geles de 16cm ² cada uno	

Solución reguladora de ácido bórico (TBE) 10X. Se puede preparar por anticipado y almacenar a temperatura ambiente

Ácido bórico	55g
Tris-base	180g
EDTA	9.3g
Aforar a 1litro con pH de 8.5. Ajustar el pH con NaOH.	

Solución reguladora de ácido bórico (TBE) 0.5X. Se puede preparar por anticipado y almacenar a temperatura ambiente

TBE 10X	50mL
Agua destilada	950mL

Solución DBG 2X. Se puede preparar por anticipado y a 4°C

HEPES, pH 7.8	240mM
EDTA, pH 8.0	1mM
MgCl ₂	8mM
KCl	120mM
Glicerol	50%

Solución BDG 1X. Se reparar al momento

BDG 2X	500 µL
DDT 100mM	50 µL
Agua destilada	450 µL

Mezcla de reacción para las muestras para EMSA. Se prepara al momento

Espermidina (4mM)	4µL
MgCl ₂ (4mM)	4µL
Buffer de unión (BDG 1X)	5µL
Poly (d:I)(d:C)	1µL

Solución de lisis: Hipotónica. Se prepara al momento

REACTIVO	STOCK	[] EMPLEADA	p/ 10mL
Tris-Cl, pH= 7.0	1M	10mM	100 μ L
NaCl	1M	10mM	100 μ L
MgCl ₂	600mM	6mM	100 μ L
NaF	1M	3.2mM	32 μ L
Na ₃ VO ₄	250mM	1mM	40 μ L
DTT	200mM	1mM	50 μ L
PMSF	100mM	1mM	100 μ L
H ₂ O			9478 μ L

Solución de extracción: Hipertónica. Se prepara al momento

REACTIVO	STOCK	[] EMPLEADA	p/ 1mL
HEPES	1M	20mM	20 μ L
NaCl	1M	420mM	420.17 μ L
Glicerol		20%	200 μ L
MgCl ₂	0.5M	1.5mM	3 μ L
EDTA	200mM	0.2mM	1 μ L
NaVO ₄	0.5M	1mM	2 μ L
NaF	0.8M	10mM	12.5 μ L
PMSF	100mM	0.2mM	2 μ L
DTT	200mM	1mM	5 μ L
H ₂ O			334.33 μ L

Tris-Cl (1 M) pH 7.0 Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

Tris-Cl	1.58 g
H ₂ O	10 mL

NaCl (1 M). Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

NaCl	0.58 g
H ₂ O	10 mL

MgCl₂ (600 mM). Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

MgCl ₂	0.57 g
H ₂ O	10 mL

Nota.- Si el reactivo está como MgCl₂·6H₂O entonces se pesarán 1.22 g de MgCl₂ y se aforaran a 10 mL con agua.

NaF (1M). Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

NaF	0.21 g
H ₂ O	5 mL

Na₃VO₄ (250 mM). Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

Na ₃ VO ₄	0.23 g
H ₂ O	5 mL

HEPES (1M). Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

HEPES	1.30 g
H ₂ O	5 mL

Glicerol 20%. Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

Glicerol	2.0 g
H ₂ O	10 mL

MgCl₂ (0.5 M). Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

MgCl ₂	0.048 g
H ₂ O	1 mL

Nota.- Si el reactivo está como MgCl₂·6H₂O entonces se pesarán 0.1 g de MgCl₂ y se aforará a 1 mL con agua.

EDTA (200 mM). Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

EDTA disódica·2H ₂ O	0.075 g
H ₂ O	1 mL

Na₃VO₄ (0.5 M). Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

Na ₃ VO ₄	0.092 g
H ₂ O	1 mL

NaF (0.8 M). Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

NaF	0.34 g
H ₂ O	10 mL

IGEPAL al 10%. Se puede preparar por anticipado y almacenar a 4°C

IGEPAL	0.1 g
H ₂ O	1 mL

BIBLIOGRAFÍA

- Agashe, V. R. and F. U. Hartl (2000). "Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding." Semin Cell Dev Biol **11**(1): 15-25.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Arnold-Schild, D., D. Hanau, et al. (1999). "Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells." J Immunol **162**(7): 3757-3760.
- Asea, A., E. Kabingu, et al. (2000). "HSP70 peptidbearing and peptide-negative preparations act as chaperokines." Cell Stress Chaperones **5**(5): 425-431.
- Asea, A., S. K. Kraeft, et al. (2000). "HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine." Nat Med **6**(4): 435-442.
- Asea, A., M. Rehli, et al. (2002). "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." J Biol Chem **277**(17): 15028-15034.
- Basu, S., R. J. Binder, et al. (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." Int Immunol **12**(11): 1539-1546.
- Basu, S. and P. K. Srivastava (2000). "Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses." Cell Stress Chaperones **5**(5): 443-451.
- Bausinger, H., D. Lipsker, et al. (2002). "Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation." Eur J Immunol **32**(12): 3708-3713.
- Becker, T., F. U. Hartl, et al. (2002). "CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes." J Cell Biol **158**(7): 1277-1285.
- Beere, H. M., B. B. Wolf, et al. (2000). "Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome." Nat Cell Biol **2**(8): 469-475.
- Benitez-King, G., L. Ortiz-Lopez, et al. (2006). "Phosphorylation-dephosphorylation imbalance of cytoskeletal associated proteins in neurodegenerative diseases." Recent Pat CNS Drug Discov **1**(2): 219-230.
- Berwin, B., J. P. Hart, et al. (2003). "Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells." EMBO J **22**(22): 6127-6136.
- Binder, R. J., K. M. Anderson, et al. (2000). "Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells *in vivo*." J Immunol **165**(11): 6029-6035.
- Binder, R. J., D. K. Han, et al. (2000). "CD91: a receptor for heat shock protein gp96." Nat Immunol **1**(2): 151-155.
- Binder, R. J. and P. K. Srivastava (2004). "Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6128-6133.
- Bonorino, C., N. B. Nardi, et al. (1998). "Characteristics of the strong antibody response to mycobacterial Hsp70: a primary, T cell-dependent IgG response with no evidence of natural priming or gamma delta T cell involvement." J Immunol **161**(10): 5210-5216.
- Borges, T. J., L. Wieten, et al. (2012). "The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70." Front Immunol **3**: 95.
- Chen, H., Y. Wu, et al. (2006). "Hsp70 inhibits lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by interacting with TRAF6 and inhibiting its ubiquitination." FEBS Lett **580**(13): 3145-3152.
- Delneste, Y., G. Magistrelli, et al. (2002). "Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation." Immunity **17**(3): 353-362.
- Detanico, T., L. Rodrigues, et al. (2004). "Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation." Clin Exp Immunol **135**(2): 336-342.

- Donati, Y. R., D. O. Slosman, et al. (1990). "Oxidative injury and the heat shock response." Biochem Pharmacol **40**(12): 2571-2577.
- Ehrnsperger, M., S. Graber, et al. (1997). "Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation." EMBO J **16**(2): 221-229.
- Enomoto, Y., A. Bharti, et al. (2006). "Enhanced immunogenicity of heat shock protein 70 peptide complexes from dendritic cell-tumor fusion cells." J Immunol **177**(9): 5946-5955.
- Fan, C. Y., S. Lee, et al. (2003). "Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40." Cell Stress Chaperones **8**(4): 309-316.
- Fang, H., Y. Wu, et al. (2011). "Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response." J Biol Chem **286**(35): 30393-30400.
- Feder, M. E. and G. E. Hofmann (1999). "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology." Annu Rev Physiol **61**: 243-282.
- Fleshner, M., J. Campisi, et al. (2004). "Cat exposure induces both intra- and extracellular Hsp72: the role of adrenal hormones." Psychoneuroendocrinology **29**(9): 1142-1152.
- Gabai, V. L., K. Mabuchi, et al. (2002). "Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis." Mol Cell Biol **22**(10): 3415-3424.
- Gabai, V. L., J. A. Yaglom, et al. (2000). "Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death." Mol Cell Biol **20**(18): 6826-6836.
- Gabriele, T., M. Tavariva, et al. (1996). "Analysis of heat shock protein 70 in human chromosome 21 containing hybrids." Int J Biochem Cell Biol **28**(8): 905-910.
- Gao, B. and M. F. Tsan (2003). "Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages." J Biol Chem **278**(1): 174-179.
- Gao, B. and M. F. Tsan (2004). "Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages." Biochem Biophys Res Commun **317**(4): 1149-1154.
- Garrido, C., C. Paul, et al. (2012). "The small heat shock proteins family: The long forgotten chaperones." Int J Biochem Cell Biol.
- Gastpar, R., M. Gehrmann, et al. (2005). "Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells." Cancer Res **65**(12): 5238-5247.
- Gong, J., B. Zhu, et al. (2009). "T cell activation by heat shock protein 70 vaccine requires TLR signaling and scavenger receptor expressed by endothelial cells-1." J Immunol **183**(5): 3092-3098.
- Gross, C., D. Hansch, et al. (2003). "Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94." Biol Chem **384**(2): 267-279.
- Guzhova, I., K. Kislyakova, et al. (2001). "In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance." Brain Res **914**(1-2): 66-73.
- Haslbeck, M., T. Franzmann, et al. (2005). "Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins." Nat Struct Mol Biol **12**(10): 842-846.
- Haslbeck, M., S. Walke, et al. (1999). "Hsp26: a temperature-regulated chaperone." EMBO J **18**(23): 6744-6751.
- Haworth, R., N. Platt, et al. (1997). "The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock." J Exp Med **186**(9): 1431-1439.
- Hendrick, J. P. and F. U. Hartl (1993). "Molecular chaperone functions of heat-shock proteins." Annu Rev Biochem **62**: 349-384.

- Jaattela, M. and D. Wissing (1992). "Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine." Ann Med **24**(4): 249-258.
- Jeannin, P., B. Bottazzi, et al. (2005). "Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors." Immunity **22**(5): 551-560.
- Joza, N., S. A. Susin, et al. (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." Nature **410**(6828): 549-554.
- Kiang, J. G. and G. C. Tsokos (1998). "Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology." Pharmacol Ther **80**(2): 183-201.
- Kingston, A. E., C. A. Hicks, et al. (1996). "A 71-kD heat shock protein (hsp) from *Mycobacterium tuberculosis* has modulatory effects on experimental rat arthritis." Clin Exp Immunol **103**(1): 77-82.
- Kopecek, P., K. Altmannova, et al. (2001). "Stress proteins: nomenclature, division and functions." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **145**(2): 39-47.
- Kregel, K. C. (2002). "Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance." J Appl Physiol **92**(5): 2177-2186.
- Kurucz, I., B. Tombor, et al. (1999). "Ultrastructural localization of Hsp-72 examined with a new polyclonal antibody raised against the truncated variable domain of the heat shock protein." Cell Stress Chaperones **4**(2): 139-152.
- Lee, G. J., A. M. Roseman, et al. (1997). "A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state." EMBO J **16**(3): 659-671.
- Lehner, T., L. A. Bergmeier, et al. (2000). "Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity." Eur J Immunol **30**(2): 594-603.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-489.
- Lindquist, S. and E. A. Craig (1988). "The heat-shock proteins." Annu Rev Genet **22**: 631-677.
- Luo, X., X. Zuo, et al. (2008). "Release of heat shock protein 70 and the effects of extracellular heat shock protein 70 on the production of IL-10 in fibroblast-like synoviocytes." Cell Stress Chaperones **13**(3): 365-373.
- Luo, X., X. Zuo, et al. (2008). "Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor-alpha induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes." Arthritis Res Ther **10**(2): R41.
- Manicassamy, S. and B. Pulendran (2009). "Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors." Semin Immunol **21**(4): 185-193.
- Martin, J. L., R. Mestral, et al. (1997). "Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes." Circulation **96**(12): 4343-4348.
- Matzinger, P. (1998). "An innate sense of danger." Semin Immunol **10**(5): 399-415.
- May, M. J. and S. Ghosh (1997). "Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview." Semin Cancer Biol **8**(2): 63-73.
- McLeish, K. R., W. L. Dean, et al. (1989). "Role of intracellular calcium in priming of human peripheral blood monocytes by bacterial lipopolysaccharide." Inflammation **13**(6): 681-692.
- Minami, Y., J. Hohfeld, et al. (1996). "Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40." J Biol Chem **271**(32): 19617-19624.
- Morshauer, R. C., W. Hu, et al. (1999). "High-resolution solution structure of the 18 kDa substrate-binding domain of the mammalian chaperone protein Hsc70." J Mol Biol **289**(5): 1387-1403.
- Noessner, E., R. Gastpar, et al. (2002). "Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells." J Immunol **169**(10): 5424-5432.

- Otterbein, L. E. and A. M. Choi (2000). "Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**(6): L1029-1037.
- Panjwani, N. N., L. Popova, et al. (2002). "Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs." *J Immunol* **168**(6): 2997-3003.
- Park, H. S., S. G. Cho, et al. (2002). "Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1." *Mol Cell Biol* **22**(22): 7721-7730.
- Pittet, J. F., H. Lee, et al. (2002). "Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival." *J Trauma* **52**(4): 611-617; discussion 617.
- Pockley, A. G., J. Shepherd, et al. (1998). "Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals." *Immunol Invest* **27**(6): 367-377.
- Pope, R. M., R. M. Lovis, et al. (1992). "Activation of synovial fluid T lymphocytes by 60-kd heat-shock proteins in patients with inflammatory synovitis." *Arthritis Rheum* **35**(1): 43-48.
- Prohaszka, Z. and G. Fust (2004). "Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life." *Mol Immunol* **41**(1): 29-44.
- Quayle, A. J., K. B. Wilson, et al. (1992). "Peptide recognition, T cell receptor usage and HLA restriction elements of human heat-shock protein (hsp) 60 and mycobacterial 65-kDa hsp-reactive T cell clones from rheumatoid synovial fluid." *Eur J Immunol* **22**(5): 1315-1322.
- Raposo, G., H. W. Nijman, et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." *J Exp Med* **183**(3): 1161-1172.
- Res, P. C., C. G. Schaar, et al. (1988). "Synovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis." *Lancet* **2**(8609): 478-480.
- Ritossa, F. (1996). "Discovery of the heat shock response." *Cell Stress Chaperones* **1**(2): 97-98.
- Roep, B. O. (1996). "T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the Holy Grail." *Diabetes* **45**(9): 1147-1156.
- Sakahira, H. and S. Nagata (2002). "Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase." *J Biol Chem* **277**(5): 3364-3370.
- Saraiva, M. and A. O'Garra (2010). "The regulation of IL-10 production by immune cells." *Nat Rev Immunol* **10**(3): 170-181.
- Shi, Y., Z. Tu, et al. (2006). "The inhibition of LPS-induced production of inflammatory cytokines by HSP70 involves inactivation of the NF-kappaB pathway but not the MAPK pathways." *Shock* **26**(3): 277-284.
- Somersan, S., M. Larsson, et al. (2001). "Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells." *J Immunol* **167**(9): 4844-4852.
- Sondermann, H., T. Becker, et al. (2000). "Characterization of a receptor for heat shock protein 70 on macrophages and monocytes." *Biol Chem* **381**(12): 1165-1174.
- Song, J. M., H. X. Liu, et al. (2008). "Extracellular heat-shock protein 70 aggravates cerulein-induced pancreatitis through toll-like receptor-4 in mice." *Chin Med J (Engl)* **121**(15): 1420-1425.
- Sonna, L. A., J. Fujita, et al. (2002). "Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression." *J Appl Physiol* **92**(4): 1725-1742.
- Srivastava, P. (2002). "Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses." *Annu Rev Immunol* **20**: 395-425.
- Srivastava, P. K. and R. J. Amato (2001). "Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents." *Vaccine* **19**(17-19): 2590-2597.
- Srivastava, P. K., H. Udono, et al. (1994). "Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming." *Immunogenetics* **39**(2): 93-98.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." *Nature* **397**(6718): 441-446.

- Theriault, J. R., H. Adachi, et al. (2006). "Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70." *J Immunol* **177**(12): 8604-8611.
- Tissieres, A., H. K. Mitchell, et al. (1974). "Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs." *J Mol Biol* **84**(3): 389-398.
- Tsan, M. F. and B. Gao (2009). "Heat shock proteins and immune system." *J Leukoc Biol* **85**(6): 905-910.
- Tsuruta, F., J. Sunayama, et al. (2004). "JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins." *EMBO J* **23**(8): 1889-1899.
- Wallin, R. P., A. Lundqvist, et al. (2002). "Heat-shock proteins as activators of the innate immune system." *Trends Immunol* **23**(3): 130-135.
- Welch, W. J. (1993). "How cells respond to stress." *Sci Am* **268**(5): 56-64.
- Wendling, U., L. Paul, et al. (2000). "A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue." *J Immunol* **164**(5): 2711-2717.
- Wheeler, D. S., M. A. Chase, et al. (2009). "Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4." *Respir Res* **10**: 31.
- Yao, Y. W., G. H. Zhang, et al. (2011). "Lipopolysaccharide pretreatment protects against ischemia/reperfusion injury via increase of HSP70 and inhibition of NF-kappaB." *Cell Stress Chaperones* **16**(3): 287-296.
- Zhu, X., X. Zhao, et al. (1996). "Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK." *Science* **272**(5268): 1606-1614.
- Zitvogel, L., N. Fernandez, et al. (1999). "Dendritic cells or their exosomes are effective biotherapies of cancer." *Eur J Cancer* **35 Suppl 3**: S36-38.
- Zitvogel, L., A. Regnault, et al. (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." *Nat Med* **4**(5): 594-600.