

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO, MUERTE CELULAR Y RESPUESTA ANTITUMORAL

HEAT SHOCK PROTEINS, CELL DEATH AN ANTITUMORAL RESPONSE

S. Fiorentino¹, A. Barreto¹, A. Asea²

¹ Grupo de Inmunobiología y Biología Celular. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 # 43-82. Bogotá, Colombia

² Proteomics Laboratory. System Health Science Center College of Medicine. Scott & White Memorial Hospital and Clinic and The Texas A&M University, USA
susana.fiorentino@javeriana.edu.co

Resumen

Las proteínas de choque térmico (HSPs), particularmente la proteína inducible Hsp72, tienen un papel importante en el favorecimiento de una respuesta antitumoral, transportando péptidos inmunogénicos o actuando como inmunoestimulantes, induciendo la activación y maduración de células dendríticas (DC). La función básica de estas proteínas, como chaperonas moleculares dependientes de ATP, incrementa la sobrevivencia celular bajo cualquier tipo de estrés. La función chaperona es natural para la estructura de las proteínas de la familia Hsp70, las cuales tienen un dominio C-terminal que une proteínas no-plegadas y péptidos y adicionalmente tiene un N-terminal con actividad ATPasa que controla la apertura y cierre del surco de unión al péptido. Su papel inmunoestimulante podría antagonizar con su actividad protectora contra la muerte celular inducida por estrés o agentes citotóxicos. La Hsp70 inducible está implicada en llevar a cabo estas dos funciones, los cuales son el propósito de esta revisión. Además, es posible que otros miembros de la familia Hsp70 estén implicados, pero en diferentes formas: induciendo respuesta inmune o como promotores del crecimiento tumoral inhibiendo la apoptosis. La comprensión de los mecanismos que regulan las dos actividades, es crucial en el desarrollo de una terapia efectiva antitumoral a través de la búsqueda de sustancias que, preservando su potencial inmunogénico, no incrementen la resistencia del tumor a la terapia antitumoral clásica.

Palabras clave: proteínas de choque térmico, cáncer, apoptosis, respuesta inmune antitumoral.

Abstract

Heat shock proteins (HSP), particularly inducible HSP72 protein, have an important role generating an effective antitumoral response as immunogenic peptide carriers or as immunostimulants, when induce activation and maturation of dendritic cells (DC). These proteins, as molecular chaperones ATP dependant, increase cell survival under any kind of stress. Chaperone function is intrinsic of protein family HSP70 structure, having a C-terminal domain that binds unfolded proteins and peptides and a N-terminal ATPase domain that controls peptide binding pocket opening and closing. Their immunostimulant role may antagonize with their protective activity against cell death induced by stress or cytotoxic agents. Inducible HSP70 protein is involved in carrying out these two functions, which is the purpose of this review. Furthermore, other members of HSP70 protein family could be implicated, but in different ways: inducing immune response or promoting tumoral growth inhibiting apoptosis. Comprehension of mechanisms that regulate both activities is crucial in developing an effective antitumoral therapy through searching substances, which preserving their immunogenic potential, do not increase tumor resistance to classical antitumoral therapy.

Key words: antitumoral therapy, apoptosis, cancer, exosomes, heat shock proteins, immunostimulation.

HSPS COMO INMUNOESTIMULANTES

Las proteínas de choque térmico (HSPs) se han descrito como chaperonas moleculares que participan en el ensamblaje y transporte de proteínas y polipéptidos tanto en condiciones normales como luego de estímulos estresantes. Una de las proteínas de choque térmico más estudiadas es la HSP70 inducible, la cual fue descrita inicialmente como un antígeno asociado con el rechazo de los sarcomas murinos inducidos químicamente (Udono *et al.*, 1994). Posteriormente se postuló que estas HSPs derivadas de tumor podían cargar péptidos con potencial antigénico para favorecer el fenómeno conocido como *cross-priming* o sensibilización cruzada. Éste consiste en la presentación de antígenos extracelulares por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), a través de la vía endógena, con la consecuente sensibilización de los linfocitos T citotóxicos con los péptidos transportados por HSPs como la HSP70 (Blachere *et al.*, 1997; Srivastava, 1994). Cuando las células presentadoras de antígeno capturan los complejos HSP/péptido a través de receptores (CD91, CD36), la presentación por la vía endógena es eficiente dado que el péptido es protegido de la degradación por proteasas citoplásmicas (Basu *et al.*, 2001; Binder *et al.*, 2001). Una clara demostración del papel de las HSPs en la transferencia antigénica, fue realizado usando ratones *Knock out* para el gen *Hsf1*, principal factor de transcripción de la síntesis de HSP70 inducible. En estos ratones, la sensibilización cruzada *cross priming* de los antígenos expresados solamente en queratinocitos está claramente disminuida (Zheng y Li, 2004).

La HSP70 *per se*, puede activar las células presentadoras de antígeno, a través de los receptores Toll 2, Toll 4 y CD14, induciendo moléculas coestimuladoras y citocinas

proinflamatorias que regulan la respuesta inmune adaptativa, razón por la cual estas HSPs han sido llamadas chaperoquinas (Somersan *et al.*, 2001; Asea *et al.*, 2000, Asea *et al.*, 2002; Basu *et al.*, 2000). Varios investigadores han propuesto que la expresión anormal de HSPs sobre la superficie de las células tumorales, podría permitir el reconocimiento por las células asesinas naturales (NK) (Fujieda *et al.*, 1995; Multhoff *et al.*, 1997) o linfocitos T (LT) $\gamma\delta$ (Tamura *et al.*, 1993). Este mecanismo de citotoxicidad podría implicar un aumento en la captación de granzima B, a través de la unión a la HSP70 (Gross *et al.*, 2003), lo que explicaría las observaciones previas donde se ha evidenciado un incremento de la actividad de las células citotóxicas, mediado por HSP70 (Dressel *et al.*, 2000). Además la HSP70 puede también incrementar la apoptosis mediada por el receptor T (TCR) a través de su interacción directa con la DNasa activada por caspasas (CAD), aumentando su actividad (Liu *et al.*, 2003).

LIBERACIÓN DE HSP E INMUNOMODULACIÓN

La actividad inmunomoduladora de las HSPs depende de su liberación al medio extracelular. Recientemente, se ha reportado la liberación activa de proteínas HSP70 por células mononucleares de sangre periférica sin compromiso de la viabilidad celular (Hunter-Lavin *et al.*, 2004). Esto explica los niveles detectables de HSP70 encontrados en suero de individuos aparentemente normales, en pacientes con procesos inflamatorios o infecciones crónicas; (Pittet *et al.*, 2002; Njemini *et al.*, 2003; Njemini *et al.*, 2004), y aun en células mononucleares con linfoma de Hodkin (Quijano *et al.*, 2003) o con otros tumores. Adicionalmente, nosotros hemos observado que la forma constitutiva de la HSP70, la HSC70 es liberada por células tumorales

estresadas por calor o por citocinas como IFN γ o IL-10. En este caso, la HSP70 también se moviliza a la membrana plasmática, y luego se secreta (Barreto *et al.*, 2003), tal como se ha reportado en otros modelos (Broquet *et al.*, 2003). La movilización de la HSP70 en presencia de citocinas y aún más en condiciones normales, hace suponer que las funciones inmunorreguladoras existen en condiciones normales y patológicas, y que su actividad es intermediaria de la modulación de la función de otras células como los macrófagos, los cuales estimulados por la HSP70 incrementan la recuperación tisular en caso de injuria tisular (Kovalchin *et al.*, 2006).

Los tratamientos con inhibidores como la monesina, brefeldina A o metil- β -diclodextrina han mostrado que la liberación de HSP ocurre por una vía exocítica no clásica, dependiente de Ca^{++} y en algunos casos asociado con los rafts lipídicos (Hunter-Lavin *et al.*, 2004; Broquet *et al.*, 2003). Alternativamente, el aumento de la HSP70 en los sobrenadantes celulares tratados con detergentes ha permitido proponer una vía importante para la liberación de HSP70 en respuesta al calor, IFN γ e IL-10, la cual puede ser en asociación con unas estructuras vesiculares llamadas exosomas (Lancaster *et al.*, 2005; Gastpar *et al.*, 2005; Bausero *et al.*, 2005). Estas observaciones sugieren que la HSP70 soluble podría tener una función inmunomoduladora al activar las células dendríticas (CD), actuando como una señal de peligro, y en contraste, la HSP70 presente en los exosomas podría actuar como un caballo de Troya, transportando antígenos tumorales para ser presentados por sensibilización cruzada.

LOS EXOSOMAS COMO REGULADORES DE LA RESPUESTA INMUNE

Los exosomas son estructuras complejas a las cuales se les ha atribuido actividad

inmunomoduladora, especialmente en modelos de inmunidad antitumoral (Thery *et al.*, 2002b). Los exosomas pueden ser obtenidos de diversos tipos celulares tales como células tumorales, epiteliales intestinales, mastocitos, células infectadas infectadas con virus o aun células dendríticas (DC) (Andre *et al.*, 2002a; Andre *et al.*, 2002b; Wolfers *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2003; Van Niel *et al.*, 2003; Skokos *et al.*, 2003; Thery *et al.*, 1999; Thery *et al.*, 2002a). La formación de los exosomas está asociada con los cuerpos multivesiculares y la vía endocítica (Raposo *et al.*, 1996); y adicionalmente con los rafts lipídicos los cuales son estructuras que juegan un papel importante en la selección de proteínas durante la formación de los exosomas, por lo menos para las moléculas del CMH II. Adicionalmente, la presencia de HSP70 y HSC70 en los exosomas ha sido claramente demostrada (Lancaster *et al.*, 2005; Thery *et al.*, 1999) y al parecer su papel de chaperona podría regular la selección de proteínas o de péptidos en estos estudios.

El papel de los exosomas derivados de las CD en la inducción de la respuesta antitumoral ha sido claramente demostrada (Zitvogel *et al.*, 1998) así como la presencia de moléculas asociadas a la adherencia celular (ICAM-1) y moléculas coestimuladoras (revisado en Thery *et al.*, 2002b), lo cual facilita la inducción de la respuesta inmune. En contraste, el papel *in vivo* de los exosomas derivados de células infectadas o tumorales no ha sido completamente esclarecido. De hecho la secreción de exosomas se realiza normalmente por células somáticas como un mecanismo para descartar los productos innecesarios (Johnstone *et al.*, 1987) y es posible que la secreción y captura de estos exosomas por las CD pueda servir para mantener una respuesta inmune supresora contra antígenos propios. Este proceso estaría regulado por la activación efectiva de las CD, y el tipo

de péptido contenido en los exosomas, el cual podría depender del tipo de citocina presente en el medio extracelular. Es así, que los exosomas pueden ser liberados en presencia de IL-10 o IFN- γ (Kim *et al.*, 2005; Bausero *et al.*, 2005), pero la diferencia entre los péptidos presentados después del tratamiento con una u otra citocina es desconocida. No sería sorprendente encontrar que los péptidos serían diferentes en cada caso, debido a la acción de las citocinas sobre el proteasoma y el inmunoproteasoma (Loukissa *et al.*, 2000) y que la representación de los péptidos inmunodominantes o subdominantes en cada exosoma constituya la diferencia. Se podría hipotetizar que la secreción de exosomas en respuesta a la IL-10, podría inducir la activación de clonas de linfocitos T reguladoras, mientras que aquellos liberados en respuesta a IFN- γ , podrían inducir una respuesta efectora.

La eficiencia de la inmunización con exosomas derivados de células dendríticas, ha comenzado a ser evaluada en humanos (Escudier *et al.*, 2005; Morse *et al.*, 2005) y aunque se ha observado una disminución en el tumor junto con la inducción de una respuesta antitumoral, es claro que la utilización de exosomas obtenidos de CD autólogas, constituye un proceso complicado y poco práctico. En contraste, el uso de exosomas derivados de células tumorales ha mostrado ser una buena elección para inducir una respuesta antitumoral efectiva frente a melanoma y plasmocitoma murino (observaciones personales y Altieri *et al.*, 2004). Una buena alternativa podría ser la inducción *in vivo* de la secreción de exosomas de células tumorales. De hecho, los exosomas derivados de células tumorales estresadas con calor, que contienen altas concentraciones de HSP70, inducen una mejor sensibilización de linfocitos T citotóxicos (Dai *et al.*, 2005). Adicionalmente, la inducción de

HSP70 dentro de la célula blanco antes de la muerte celular, luego del tratamiento con agentes citotóxicos podría ser una buena alternativa para incrementar la inmunogenicidad de los tumores e inducir una respuesta inmune específica. Esta alternativa, debe ser evaluada con cuidado dado que algunas veces la inoculación de exosomas derivados de células tumorales, tiene efectos adversos, favoreciendo el crecimiento del tumor (Liu *et al.*, 2006). Lo anterior nos hace tener en consideración la existencia de mecanismos adicionales que permiten la activación de las CD, por ejemplo, un buen medioambiente inflamatorio podría permitir la activación de células efectoras luego de la captura de antígenos transportados por exosomas. La ausencia de este microambiente, podría permitir la anergización de las células T y esto podría en parte ser incrementado por la ausencia de HSP70 sobre algunas de estas estructuras como se ha mostrado recientemente (Clayton *et al.*, 2005). Estas observaciones, hacen que la coexistencia de la secreción de HSP70 dentro y fuera de estas vesículas sea importante.

SECRECIÓN DE HSPTS DURANTE LA MUERTE CELULAR

Cuando la liberación de HSP70 es pasiva, ella puede ejercer actividad inmunoestimulante especialmente durante la muerte de células por necrosis, aunque, la muerte de células por apoptosis podría también tener esta actividad (Todryk *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Kokhaei *et al.*, 2004). El tratamiento de las células tumorales con doxorubicina o epirubicina, aumenta la expresión de HSP70, induce necrosis tardía, permite una mejor transferencia del antígeno a las DC y en consecuencia una eficiente sensibilización primaria de LT citotóxicos restringidos por clase I (Buttiglieri *et al.*, 2003). Nosotros demostramos recientemente que las CD cargadas

con células necróticas tumorales de leucemia linfóide de tipo T, las cuales son muy poco inmunogénicas, pero no apoptóticas, inducen respuesta antitumoral que puede incrementarse en ausencia de LT reguladores CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺; esto permite una eliminación completa de los tumores así como la aparición de memoria inmune efectiva. (Fiorentino *et al.*, 2005).

Muchos factores han sido postulados con el fin de explicar las diferencias entre la actividad de las células apoptóticas vs necróticas. La presencia de un medio ambiente inflamatorio, generado por la destrucción tisular durante el proceso de necrosis es uno de ellos (Crittenden *et al.*, 2003). Adicionalmente, la formación de complejos HSP70-péptido y posiblemente su inmunogenicidad podría ser aumentada en condiciones de estrés tal como se ha sugerido recientemente (Callahan *et al.*, 2002). Se supone que para una buena respuesta inmune, se debería seguir la siguiente cinética. La liberación inicial de HSP por la célula blanco podría estimular la actividad de las células NK y la síntesis de IFN γ independiente de su actividad como chaperona (Multoff *et al.*, 1999). El IFN γ producido por las células NK, permitiría la activación tardía del inmunoproteasoma que procesaría proteínas inmunogénicas produciendo diferentes péptidos inmunodominantes a partir de péptidos subdominantes generados por el proteasoma constitutivo (Basler *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, el IFN γ podría incrementar la secreción de exosomas favoreciendo la inducción de una respuesta antitumoral específica. Esto último podría significar que la muerte celular a través de mecanismos que permitan un procesamiento efectivo de los antígenos tumorales, la eficiente transferencia a las CD y la adecuada presentación por células dendríticas activadas, son los elementos clave para la inducción de una respuesta inmune protectora.

REGULACIÓN DE LA HSP70 EN CÉLULAS TUMORALES DURANTE LA MUERTE POR APOPTOSIS O NECROSIS

La resistencia a la muerte celular, particularmente la muerte por apoptosis, constituye un aspecto importante en el desarrollo de la resistencia a fármacos anticancerígenos. Sin embargo, muchas células tumorales conservan su habilidad de sufrir detención en el ciclo celular o de morir por otras causas diferentes a la apoptosis, como la necrosis, la autofagia, la senescencia o la catástrofe mitótica. Estas opciones abren la posibilidad de inducir la muerte de las células tumorales por mecanismos no apoptóticos, con el fin de confundir la sobrevivencia de las clonas resistentes a fármacos. Hasta el presente, se ha documentado ampliamente la participación de la HSP70 en el incremento de la sobrevida a la muerte por apoptosis. Sin embargo, su participación en los otros tipos de muerte es menos conocida. En la actualidad es aceptado que la muerte por necrosis también es regulada negativamente por la HSP, lo que ha motivado al desarrollo de terapias antitumorales que tengan como blanco las HSP. El mantenimiento de la integridad celular es una función clásica de la HSP70, protegiendo la célula de la muerte natural o inducida (Gabai *et al.*, 2005; Gibbons *et al.*, 2000); regulando negativamente muchas vías implicadas en la apoptosis (Beere *et al.*, 2004b; Beere *et al.*, 2005c; Sreedhar y Csermely, 2004). La terapia antitumoral convencional induce la síntesis de HSP, y aunque esta puede participar en la transferencia de antígenos tumorales, también puede favorecer la acumulación de mutaciones tumorales, al prevenir la apoptosis facilitando la progresión del tumor hacia formas más agresivas (Csermely, 2001).

PAPEL DE LA HSP70 EN LA FASE INICIAL DE LA APOPTOSIS

La muerte celular por apoptosis es mediada por caspasas (proteasas de cisteína) que clivan los residuos de aspartato inhibiendo o activando los sustratos blanco de su actividad (Wolf y Green, 1999). La secuencia de eventos que finalizan en la activación de las caspasas puede dividirse en tres fases: i) fase de iniciación (o de señalización), la fase donde los dominios de muerte participan con receptores de superficie, particularmente con los miembros de la familia de factor de necrosis tumoral y la vía mitocondrial la cual puede ser activada a través de sus receptores por otros estímulos; ii) fase de transducción (o de preparación) donde ocurre la activación de las caspasas iniciadoras, de ciertas kinasas y fosfatasas y iii) fase de ejecución (o fase de muerte) donde se activan las caspasas efectoras (Sreedhar y Csermely, 2004). Las HSPs pueden participar directa o indirectamente en cualquiera de estas fases, regulando positiva o negativamente su desarrollo.

La fase de iniciación puede empezar cuando un ligando específico encuentra uno o varios receptores de muerte sobre la superficie, presentes en los LT o células NK (Screaton y Xu, 2000). El receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR-1) y los receptores Fas contienen dominios de muerte (DD), que pueden reclutar moléculas adaptadoras asociadas con los DD tales como TRADD o FADD asociadas a TNFR1 o Fas respectivamente. Las interacciones homotípicas entre DD de Fas y FADD inducen el reclutamiento y el autoclivaje de la caspasa 8 (Chinnaiyan *et al.*, 1995). En cuanto a la señal inducida por TNF, TRADD es reclutado por FADD como consecuencia de la formación y liberación del complejo TNFR1 (Chinnaiyan *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1996a; Hsu *et al.*, 1996b; Micheau *et al.*, 2003) para iniciar la activación de la

procaspasa la cual a su vez se autocliva, permitiendo la activación de la caspasa 3, 6 y 7 (Chang *et al.*, 2000).

La expresión de HSP70 o HSP90 puede incrementar la susceptibilidad a la muerte celular inducida por TNF, cicloheximida y Fas o por la unión de TCR/CD3 (Galea-Lauri *et al.*, 1996; Liossis *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha demostrado que la HSP70, entre todas las HSPs, modula principalmente la señal que viene a través de los receptores Fas, TNF y TRAIL (Liossis *et al.*, 1997; Mehlen *et al.*, 1996b). La HSP70 y HSP27 pueden suprimir la apoptosis cuando se unen con Daxx y ASK-1, inhibiendo su función (Charette *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002). Ambas proteínas pueden también inhibir la apoptosis inducida por TRAIL y TNF en varios tipos celulares (Ozoren *et al.*, 2003; Jaattela *et al.*, 1993; Jaattela *et al.*, 1992; Mehlen *et al.*, 1995a; Mehlen *et al.*, 1995b; Mehlen *et al.*, 1996). En otras palabras, mientras que por una parte la HSP70 permite la activación de los linfocitos T citotóxicos, favoreciendo la sensibilización cruzada, por otra parte puede inhibir la apoptosis inducida por los receptores de muerte Fas y TNF, lo que la coloca en una posición ambigua. La comprensión de estas funciones, constituye el centro de investigación de nuestro grupo.

PAPEL DE LAS HSPS EN LA MUERTE INDUCIDA POR LA VÍA MITOCONDRIAL

La mitocondria contribuye a la inducción de las vías de apoptosis tanto intrínsecas como extrínsecas. Además, la mitocondria puede integrar y difundir las señales de la vía intrínseca, generadas al interior de la célula, tales como el estrés oxidativo. Las condiciones inductoras de apoptosis, envuelven la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que conlleva a una eventual ruptura de la membrana externa, con la liberación de proteínas

proapoptóticas en el citoplasma. Al parecer, la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP) produce la disipación del potencial de la membrana mitocondrial, alterando la función de la cadena respiratoria y permitiendo la entrada de solutos, agua y consecuentemente induciendo hinchazón y ruptura de la membrana externa y liberación de proteínas activadoras de caspasas. El PTP está al parecer formado por asociación de la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT) localizada en la membrana mitocondrial interna, el canal iónico dependiente de voltaje (VDAC) localizado en la membrana mitocondrial externa, el receptor periférico de benzodiazepina (PBR) y la ciclofilina D peptidil proil isomerasa (Cyp-D). Las vías de muerte mitocondrial pueden ser activadas por estrés, drogas citotóxicas y diferentes señales que pueden disparar la traslocación de miembros de la familia de proteínas proapoptóticas Bcl-2 a la membrana mitocondrial y la liberación de los factores pro apoptóticos al citosol, tales como el citocromo c (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997a), Smac/Diablo (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000), factor inductor de apoptosis (AIF) (Susin *et al.*, 1999), EndoG (Li *et al.*, 2001) y HtrA2/Omi (Suzuki *et al.*, 2001). El mecanismo preciso por el cual el citocromo c es liberado, no ha sido claramente establecido, pero al parecer está regulado por la actividad antagonista de las proteínas de la familia de Bcl-2 (Green *et al.*, 1998a; Willis *et al.*, 2003); la cual incluye los miembros pro apoptóticos como Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bim, Bad, Bid y DIVA y las proteínas antiapoptóticas estrechamente relacionadas con Bcl-2 como Bcl-xL, Mcl-1, A1 y Boo (Green *et al.*, 1998b; Gross *et al.*, 1999, Creagh *et al.*, 2000). Una subclase de miembros pro apoptóticos que contiene exclusivamente el dominio de homología 3 (BH3) media la asociación homo/heterodímeros entre miembros de la familia incluyendo Bim, Bid y Bad, (Bouillet *et al.*, 2002). Tales pro-

teínas facilitan las actividades pro apoptóticas de Bax y Bak (Desagher *et al.*, 1999; Eskes *et al.*, 1998) y son los blancos de las proteínas de sobrevida como Bcl-2 y Bcl-xL (Cheng *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2002). Bid es clivada por la caspasa 8 para generar un Bid truncado (tBid), permitiendo la liberación de factores pro apoptóticos mitocondriales de una forma dependiente de Bax (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998, Gross *et al.*, 1999).

Las vías mitocondriales descritas anteriormente, pueden ser inhibidas por HSP. De hecho, el clivaje de Bid inducido por TNF es inhibido por la HSP70 (Gabai *et al.*, 2002). Es probable que la actividad inhibidora esté relacionada con la activación de factores antiapoptóticos dependientes de NF- κ B (Beere *et al.*, 2005c). También es probable que la HSP70 interactúe directa o indirectamente con miembros de la familia de proteínas Bcl-2. La proteína de unión a Bcl-2, BAG-1 se asocia con proteínas de sobrevida como Raf-1, receptores del factor de crecimiento y las proteínas inducible y constitutiva HSP70 y Hsc70 (Takayama *et al.*, 1998). Eso último sugiere que BAG-1 podría ser una proteína intermediaria que asocia HSP y Bcl-2 causando inhibición de la apoptosis. Se ha demostrado además que la HSP70 tiene la capacidad de interactuar directamente con Bax, evitando su translocación a la mitocondria cuando los niveles de ATP están disminuidos, lo cual inhibe finalmente la liberación de AIF (Ruchalski *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha mostrado que la HSP27 y la HSP70 tienen funciones importantes en la vía apoptótica dependiente de Fas debido a su capacidad de inhibir Bid. En el caso de la HSP27, se ha establecido que ésta evita la translocación de Bid a la mitocondria y por tanto la liberación de factores pro apoptóticos dependientes de Bax. Recientemente se ha implicado un papel cooperativo entre la HSP70 y sus co-chaperonas HSP40 (Hdj-1) o HSDJ (Hdj-2)

en la inhibición de la translocación de Bax, en la apoptosis inducida por óxido nítrico (Gotoh *et al.*, 2004).

PAPEL DE LA HSP EN LA VÍA POSMITOCONDRIAL

El citocromo c una vez en el citosol, se une a Apaf-1, una proteína citoplásmica que tiene un dominio de unión a caspasas (CARD), un dominio de unión a nucleótidos y múltiples repeticiones WD-40. Esta unión es independiente de ATP/dATP generando un incremento en la afinidad de Apaf-1 por este nucleótido. Este complejo es conocido como apoptosoma (Zou *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1999), el cual recluta y activa la caspasa 9 (Srinivasula *et al.*, 1998). La unión entre el dominio CARD y el N-terminal de Apaf-1, facilita el clivaje y la activación corriente abajo de las caspasas 3, 6 y 7 (Chang *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 1999). Esta activación de caspasas es responsable de los cambios morfológicos característicos de la apoptosis tales como condensación de la cromatina, fragmentación de DNA nucleosomal, ruptura de la membrana nuclear, externalización de la fosfatidil serina y formación de los cuerpos apoptóticos (Wang *et al.*, 2001). Recientemente, se ha demostrado que la HSP70 tiene la capacidad de asociarse con Apaf-1 a través del dominio de ATPasa (Sreedhar y Csermely, 2004), inhibiendo la oligomerización (Saleh *et al.*, 2000) o manteniendo los oligómeros en una conformación incompatible con su actividad biológica previniendo la exposición del dominio CARD (Beere *et al.*, 2000a). Cualquiera de estas últimas acciones puede prevenir la formación del apoptosoma y consecuentemente el reclutamiento de la caspasa 9 y la activación de la maquinaria apoptótica (Beere *et al.*, 2000a; Saleh *et al.*, 2000). Adicionalmente, la HSP70 puede inhibir la apoptosis inducida por óxido nítrico, contribuyendo al mantenimiento de la membrana mitocondrial (Sreedhar y Csermely, 2004).

El AIF, mencionado anteriormente, presenta una secuencia de localización mitocondrial (MLS) y luego de la señal apoptótica es liberada al citosol. La forma madura de la proteína es producida por el clivaje de MLS, la cual bajo condiciones adecuadas puede inducir apoptosis vía condensación de la cromatina y fragmentación del ADN (Wang *et al.*, 2001). La HSP70 puede inhibir tanto la acción de AIF, como la apoptosis independiente de caspasas, presente en algunas células tumorales, al disminuir la APAF-1 (Belmokhtar *et al.*, 2003; Ruchalski *et al.*, 2006; Parcellier *et al.*, 2003; Gurbuxani *et al.*, 2001; Stankiewicz *et al.*, 2005), lo que plantea un papel protector, que va más lejos que el de su actividad como chaperona molecular. Actualmente, es bien sabido que la acción concertada entre la muerte por vías apoptóticas y no apoptóticas se requiere para disminuir la talla de los tumores. De hecho el estudio de las drogas con actividad antitumoral en un modelo de ratón transgénico con linfoma, muestra que la respuesta primaria del linfoma a los agentes antitumorales es principalmente debida a la apoptosis. Sin embargo, las células tumorales remanentes, van posteriormente a una fase de senescencia que depende de la función integral de p53 e INK4A. En resumen, para que la terapia antitumoral sea efectiva en estos ratones transgénicos, tanto la apoptosis como la senescencia inducida por drogas deben ocurrir simultáneamente (Schmitt *et al.*, 2002). La co-expresión de HSP70 y p53, en carcinoma de células escamosas del esófago constituyen un factor de mal pronóstico (Miyazaki *et al.*, 2005), sugiriendo que la HSP70 puede disminuir la muerte celular a través de la regulación de la apoptosis o de la senescencia regulando la localización intracelular de la p53 como se ha propuesto anteriormente (Zylicz *et al.*, 2001). La complejidad de la familia de proteínas HSP70 puede explicar la diversidad funcional de cada uno de sus miembros. De

hecho un trabajo reciente muestra que la HSP70-2, una proteína esencial en la espermaogénesis, es un regulador importante del crecimiento tumoral (Rohde *et al.*, 2005; Daugaard *et al.*, 2005), pero su papel como inmunoestimulante aún no ha sido estudiado.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En resumen, la HSP70 soluble puede tener funciones inmunomoduladoras, activando la respuesta inmune a través de las DC, sirviendo como señal de peligro, y en los exosomas, transportando antígenos tumorales o antígenos para la sensibilización cruzada. Por otra parte, la HSP70 intracelular, actúa como factor protector aumentando la sobrevivencia de las células tumorales. Estas funciones aparentemente excluyentes, podrían estar estrechamente ligadas y ocurrir espontáneamente *in vivo*. Sin embargo, es necesario definir claramente, tanto el papel de cada uno de los miembros de la familia de las HSP así como la temporalidad de sus funciones. La búsqueda de nuevos agentes antitumorales, implica en la actualidad, no solo el análisis de los compuestos capaces de inducir apoptosis de las células tumorales, sino también de aquellos capaces de regular la síntesis o la movilización de la HSP70 así como los mecanismos que regulan las actividades antiapoptóticas e inmunoestimulantes. El conocimiento y la regulación de estas actividades, por nuevos compuestos dentro de los cuales se encuentran los productos naturales, son en la actualidad el objeto principal de trabajo de nuestro laboratorio.

LITERATURA CITADA

ALTIERI, S.L., KHAN, A.N., TOMASI, T.B. Exosomes from plasmacytoma cells as a tumor vaccine. *Journal of Immunotherapy*, 2004, 27, 282-8.

ANDRE, F., SCHARTZ, N.E., CHAPUT, N., FLAMENT, C., RAPOSO, G., AMIGORENA, S., ANGEVIN, E., ZITVOGEL, L. Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine* 20 Suppl. 4: 2002a, A28-31.

ANDRE, F., SCHARTZ, N.E., MOVASSAGH, M., FLAMENT, C., PAUTIER, P., MORICE, P., POMEL, C., LHOMME, C., ESCUDIER, B., L.E. CHEVALIER, T., TURSZ, T., AMIGORENA, S., RAPOSO, G., ANGEVIN, E., ZITVOGEL, L. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*, 2002b, 360, 295-305.

ASEA, A., KRAEFT, S.K., KURT-JONES, E.A., STEVENSON, M.A., CHEN, L.B., FINBERG, R.W., KOO, G.C., CALDERWOOD, S.K. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature medicine*, 2000, 6, 435-42.

ASEA, A., REHLI, M., KABINGU, E., BOCH, J.A., BARE, O., AURON, P.E., STEVENSON, M.A., CALDERWOOD, S.K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277, 15028-34.

BARRETO, A.; GONZÁLEZ, J.M., KABINGU, E., ASEA, A., FIORENTINO, S. Stress-induced release of HSC70 from human tumors. *Cellular Immunology*, 2003, 222, 97-104.

BASLER, M., YOUHNOVSKI, N., VAN DEN BROEK, M., PRZYBYLSKI, M., GROETTRUP, M. Immunoproteasomes down-regulate presentation of a subdominant T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Immunology*, 2004, 173, 3925-34.

- BASU, S., BINDER, R.J., SUTO, R., ANDERSON, K.M., SRIVASTAVA, P.K. 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. *International Immunology*, 2000, 12, 1539-46.
- BASU, S., BINDER, R.J., RAMALINGAM, T., SRIVASTAVA, P.K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96; hsp90; hsp70; and calreticulin. *Immunity*, 2001, 14, 303-13.
- BAUSERO, M.A., GASTPAR, R., MULTHOFF, G., ASEA, A. Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *Journal of Immunology*, 2005, 175, 2900-12.
- BEERE, H.M., WOLF, B.B., CAIN, K., KUWANA, T., TAILOR, P., MORIMOTO, R. I., COHEN, G. and GREEN, D.R. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the apaf-1 apoptosome. *Nature. Cellular Biology*, 2000, 2, 469-75.
- BEERE, H.M. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cellular Science*, 2004, 117(Pt 13), 2641-51.
- BEERE, H.M. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115, 2633-9.
- BELMOKHTAR, C.A., HILLION, J.; DUDOGNON, C., FIORENTINO, S., FLEXOR, M., LANOTTE, M., SEGAL-BENDIRDJIAN, E. Apoptosome-independent pathway for apoptosis. Biochemical analysis of APAF-1 defects and biological outcomes. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278, 29571-80.
- BINDER, R.J., KARIMEDDINI, D., SRIVASTAVA, P.K. Adjuvanticity of alpha 2-macroglobulin; an independent ligand for the heat shock protein receptor CD91. *Journal of Immunology*, 2001, 166, 4968-72.
- BLACHERE, N.E., LI, Z., CHANDAWARKAR, R.Y., SUTO, R., JAIKARIA, N.S., BASU, S., UDONO, H., SRIVASTAVA, P.K. Heat shock protein-peptide complexes; reconstituted in vitro; elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 1997, 186, 1315-22.
- BOUILLET, P. and STRASSER, A. BH3-only proteins – evolutionarily conserved pro-apoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *Journal of Cellular Science*, 2002, 1567-74.
- BROQUET, A.H., THOMAS, G., MASLIAH, J., TRUGNAN, G., BACHELET, M. Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278, 21601-6.
- BUTTIGLIERI, S., GALETTO, A., FORNO, S., DE ANDREA, M., MATELA, L. Influence of drug-induced apoptotic death on processing and presentation of tumor antigens by dendritic cells. *International Journal of Cancer*, 2003, 106, 516-20.
- CALLAHAN, M.K., CHAILLOT, D., JACQUIN, C., CLARK, P.R., and MENORET, A. Differential acquisition of antigenic peptides by Hsp70 and

- Hsc70 under oxidative conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277, 33604-9.
- CHANG, S.H., PHELPS, P.C., BEREZESKY, I.K., EBERSBERGER, M.L., TRUMP, B.F. Studies on the mechanisms and kinetics of apoptosis induced by microinjection of cytochrome c in rat kidney tubule epithelial cells (NRK-52E). *American Journal of Pathology*, 2000, 156, 637-49.
- CHARETTE, S.J., LAVOIE, J.N., LAMBERT, H. and LANDRY, J. Inhibition of daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Molecular Cell Biology*, 2000, 20, 7602-12.
- CHEN, Z., MOYANA, T., SAXENA, A., WARRINGTON, R., JIA, Z., XIANG, J. Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *International Journal of Cancer*, 2001, 93, 539-48.
- CHENG, E., WEI, M., WEILER, S., FLAVELL, R., MAK, T., LINDSTEN, T. and KORSMEYER, S. BCL-2; BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, 2001, 8, 705-11.
- CHINNAIYAN, A.M., O'ROURKE, K., TEWARI, M. and DIXIT, V.M. FADD a novel death domain containing protein; interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, 1995, 81, 505-12.
- CHINNAIYAN, A.M., TEPPER, C.G., SELDIN, M.F., O'ROURKE, K., KISCHKEL, F.C., HELLBARDT, S., KRAMMER, P.H., PETER, M.E. and DIXIT, V.M. FADD/MORT is a common mediator of CD95 (Fas/APO1) and TNFreceptor- induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271, 4961-5.
- CLAYTON, A., TURKES, A., NAVABI, H., MASON, M.D., TABI, Z. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *Journal of Cellular Science*, 2005, 118(Pt 16), 3631-8.
- CREAGH, E.M., SHEEHAN, D., COTTER, T.G. Heat shock proteins-modulators of apoptosis in tumour cells. *Leukemia*, 2000, 14, 1161-73.
- CRITTENDEN, M., GOUGH, M., HARRINGTON, K., OLIVIER, K., THOMPSON, J., VILE, R.G. Expression of inflammatory chemokines combined with local tumor destruction enhances tumor regression and long-term immunity. *Cancer Research*, 2003, 63, 5505-12.
- CSERMELY, P. Chaperone overload is a possible contributor to 'civilization diseases'. *Trends in Genetics*, 2001, 17, 701-4.
- DAI, S., WAN, T., WANG, B., ZHOU, X., XIU, F., CHEN, T., WU, Y., CAO, X. More efficient induction of HLA-A*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. *Clinical Cancer Research*, 2005, 11, 7554-63.
- DAUGAARD, M., JAATTELA, M. *Cell Cycle*, 2005, 4, 877-80.
- DESAGHER, S., OSEN-SAND, A., NICHOLS, A., ESKES, R., MONTESSUIT, S., LAUPER, S., MAUNDRELL, K., ANTONSSON, B. and MARTINOU J.C. Bid induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 1999, 144, 891-901.

- DRESSEL, R., ELSNER, L., QUENTIN, T., WALTER, L. and GUNTHER, E. Heat shock protein 70 is able to prevent heat shock-induced resistance of target cells to CTL. *Journal of Immunology*, 2000, 164, 2362-71.
- DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L. and WANG, X. Smac; a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000, 102, 33-42.
- ESCUDIER, B., DORVAL, T., CHAPUT, N., ANDRE, F., CABY, M.P., NOVAULT, S., FLAMENT, C., LÉBOULAIRE, C., BORG, C., AMIGORENA, S., BOCCACCIO, C., BONNEROT, C., DHELLIN, O., MOVASSAGH, M., PIPERNO, S., ROBERT, C., SERRA, V., VALENTE, N., LEPECQ, J.B., SPATZ, A., LANTZ, O., TURSZ, T., ANGEVIN, E., ZITVOGEL, L. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *Journal of Translational Medicine*, 2005, 3, 10.
- ESKES, R., ANTONSSON, B., OSEN-SAND, A., MONTESSUIT, S., RICHTER, C., SADOUL, R., MAZZEI, G., NICHOLS, A. and MARTINOU, J.C. Bax-induced cytochrome c release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *Journal of Cell Biology*, 1998, 143, 217-24.
- FIorentino, S., CHOPIN, M., DASTOT, H., BOISSEL, N., REBOUL, M., LEGRES, L., JANIN, A., APLAN, P., SIGAUX, F., REGNAULT, A. Disruption of T cell regulatory pathways is necessary for immunotherapeutic cure of T cell acute lymphoblastic leukemia in mice. *European Cytokine Network*, 2005, 16, 300-8.
- FUJIEDA, S., NODA, I., SAITO, H., HOSHINO, T., YAGITA, M. Heat shock enhances the susceptibility of tumor cells to lysis by lymphokine-activated killer cells. *Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 1995, 121, 1009-14.
- GABAI, V.L., BUDAGOVA, K.R., SHERMAN, M.Y. Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents. *Oncogene*, 2005, 24, 3328-38.
- GABAI, V.L., MABUCHI, K., MOSSER, D.D. and SHERMAN, M. Y. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 2002, 22, 3415-24.
- GALEA-LAURI, J., RICHARDSON, A.J., LATCHMAN, D.S. and KATZ, D.R. Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF α and cycloheximide; a possible role in immunopathology. *Journal of Immunology*, 1996, 157, 4109-18.
- GASTPAR, R., GEHRMANN, M., BAUSERO, M.A., ASEA, A., GROSS, C., SCHROEDER, J.A., MULTHOFF, G. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Research*, 2005, 65(12), 5238-47.
- GIBBONS, N.B., WATSON, R.W., COFFEY, R.N., BRADY, H.P., FITZPATRICK, J.M. Heat-shock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis. *Prostate*, 2000, 45, 58-65.

- GOTOH, T., TERADA, K., OYADOMARI, S. and MORI, M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 2004, 11, 390-402.
- GREEN, D.R. and REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, 281, 1309-12.
- GROSS, A., MCDONNELL, J.M. and KORSMEYER, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Development*, 1999, 13, 1899-1911.
- GROSS, C., KOELCH, W., DEMAYO, A., ARISPE, N. and MÜLTHOFF, G. Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278, 41173-81.
- GURBUXANI, S., BRUEY, J.M., FROMENTIN, A., LARONIER, N., PARCELLIER, A., JAATTELA, M., MARTIN, F., SOLARY, E., GARRIDO, C. Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene*, 2001, 20, 7478-85.
- HSU, H., HUANG, J., SHU, H.B., BAICHWAL, V. and GOEDDEL, D.V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor 1 signaling complex. *Immunity*, 1996a, 4, 387-96.
- HSU, H., SHU, H.B., PAN, M.G. and GOEDDEL, D.V. TRADD/TRAFF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor signal transduction pathways. *Cell*, 1996b, 84, 299-308.
- HUNTER-LAVIN, C., DAVIES, E.L., BACELAR, M.M., MARSHALL, M.J., ANDREW, S.M., WILLIAMS, J.H. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochemistry Biophysical Research Community*, 2004, 324, 511-7.
- JAATTELA, M., WISSING, D., BAUER, P.A. and LI, G.C. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO Journal*, 1992, 11, 3507-12.
- JAATTELA, M. and WISSING, D. Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity; possible mechanism of self-protection. *Journal of Experimental Medicine*, 1993, 177, 231-36.
- JOHNSTONE, R.M., ADAM, M., HAMMOND, J.R., ORR, L., TURBIDE, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262, 9412-20.
- KIM, S.H., LECHMAN, E.R., BIANCO, N., MENON, R., KERAVALA, A., NASH, J., MI, Z., WATKINS, S.C., GAMBOTTO, A., ROBBINS, P.D. Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis. *Journal of Immunology*, 2005, 174, 6440-8.
- KLUCK, R.M., BOSSY-WETZEL, E., GREEN, D.R. and NEWMAYER, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria; a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 1997, 275, 1132-1326.
- KOKHAEI, P., CHOUDHURY, A., MAHDIAN, R., LUNDIN, J., MOSHFEGH, A., OSTERBORG, A., MELLSTEDT, H. Apoptotic tumor cells are superior to tu-

- mor cell lysate; and tumor cell RNA in induction of autologous T cell response in B-CLL. *Leukemia*, 2004, 18, 1810-5.
- KOVALCHIN, J.T., WANG, R., WAGH, MS., AZOULAY, J., SANDERS, M., CHANDAWARKAR, R.Y. *In vivo* delivery of heat shock protein 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated phagocytosis. *Wound Repair & Regeneration*, 2006, 14, 129-37.
- LANCASTER, G.I., FEBBRAIO, M.A. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *Journal Biological Chemistry*, 2005, 280, 23349-55.
- LI, H., ZHU, H., XU, C.J. and YUAN, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998, 94, 491-501.
- LI, C.Y., LEE, J.S., KO, Y.G., KIM, J.I. and SEO, J.S. Hsp70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275, 25665-71.
- LI, L., LUO, X. and WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. *Nature*, 2001, 412, 95-9.
- LIOSSIS, S.N., DING, X.Z., KIANG, J.G. and TSOKOS, G.C. Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *Journal of Immunology*, 1997, 156, 68-75.
- LIU, C., YU, S., ZINN, K., WANG, J., ZHANG, L., JIA, Y., KAPPES, J.C., BARNES, S., KIMBERLY, R.P., GRIZZLE, W.E., ZHANG, H.G. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *Journal of Immunology*, 2006, 176, 1375-85.
- LIU, Q.L., KISHI, H., OHTSUKA, K. and MURAGUCHI, A. Heat shock protein 70 binds caspase-activated DNase and enhances its activity in TCRstimulated T cells. *Blood*, 2003, 102, 1788-96.
- LOUKISSA, A., CARDOZO, C., ALTSCHULLER-FELBERG, C., NELSON, J.E. Control of LMP7 expression in human endothelial cells by cytokines regulating cellular and humoral immunity. *Cytokine*, 2000, 12, 1326-30.
- LUO, X., BUDIHARDJO, I., ZOU, H., SLAUGHTER, C. and WANG, X. Bid; a Bcl2 interacting protein; mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 1998, 94, 481-90.
- MEHLEN, P., MEHLEN, A., GUILLET, D., PREVILLE, X. and ARRIGO, A.P. Tumor necrosis factor- induces changes in the phosphorylation; cellularlocalization; and oligomerization of human hsp27; a stress protein that confers cellular resistance to this cytokine. *Journal of Cell Biochemistry*, 1995a, 58, 248-59.
- MEHLEN, P., PREVILLE, X., CHAREYRON, P., BRIOLAY, J., KLEMENZ, R. ANDARRIGO, A.P. Constitutive expression of human hsp27; drosophila hsp27; or human γ -crystallin confers resistance to TNF- α and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *Journal of Immunology*, 1995b, 154, 363-74.

- MEHLEN, P., SCHULZE-OSTHOFF, K. and ARRIGO, A.P. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271, 16510-14.
- MICHEAU, O. and TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 2003, 114, 148-50.
- MIYAZAKI, T., KATO, H., KIMURA, H., INOSE, T., FARIED, A., SOHDA, M., NAKAJIMA, M., FUKAI, Y., MASUDA, N., MANDA, R., FUKUCHI, M., TSUKADA, K., KUWANO, H. Evaluation of tumor malignancy in esophageal squamous cell carcinoma using different characteristic factors. *Anti-cancer Research*, 2005, 25, 4005-11.
- MORSE, M.A., GARST, J., OSADA, T., KHAN, S., HOBEIKA, A., CLAY, T.M., VALENTE, N., SHREENIWAS, R., SUTTON, M.A., DELCAYRE, A., HSU, D.H., LE PECQ, J.B., LYERLY, H.K. A phase I study of dexamethasone immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Translational Medicine*, 2005, 3, 9.
- MULTHOFF, G., BOTZLER, C., JENNEN, L., SCHMIDT, J., ELLWART, J., ISSELS, R. Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *Journal of Immunology*, 1997, 158, 4341-50.
- MULTHOFF, G., MIZZEN, L., WINCHES-TER, C.C., MILNER, C.M., WENK, S., EISSNER, G., KAMPINGA, H.H., LAUMBACHER, B., JOHNSON, J. Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Experimental Hematology*, 1999, 27(11), 1627-36.
- NGUYEN, D.G., BOOTH, A., GOULD, S.J., HILDRETH, J.E. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278, 52347-54.
- NJEMINI, R., DEMANET, C., METS, T. Inflammatory status as an important determinant of heat shock protein 70 serum concentrations during aging. *Biogerontology*, 2004, 5, 31-8.
- NJEMINI, R., LAMBERT, M., DEMANET, C., METS, T. Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2003, 58, 664-9.
- OZOREN, N. and EL-DEIRY, W. Heat shock protects HCT116 and H460 cells from TRAIL-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*, 2003, 281, 175-81.
- PARCELLIER, A., SCHMITT, E., GUR-BUXANI, S., SEIGNEURIN-BERNY, D., PANCE, A., CHANTOME, A., PLENCHETTE, S., KHOCHBIN, S., SOLARY, E., GARRIDO, C. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23, 5790-802.
- PARK, H.S., CHO, S.G., KIM, C.K., HWANG, H.S., NOH, K.T., KIM, M.S., HUH, S.H., KIM, M.J., RYOO, K., KIM, E.K. Heat shock protein Hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22, 7721-30.
- PITTET, J.F., LEE, H., MORABITO, D., HOWARD, M.B., WELCH, W.J., MACKERSIE, R.C. Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma

- correlate with survival. *Journal of Trauma*, 2002, 52, 611-7.
- QUIJANO, S.M., SAAVEDRA, C., BRAVO, M.M., FIORENTINO, S., OROZCO, O. Expression of heat shock proteins HSP72 and HSP73 in Colombian patients with Hodgkin lymphoma positive and negative for Epstein Barr virus. *Revista Médica de Chile*, 2003, 131, 1375-81.
- RAPOSO, G., NIJMAN, H.W., STOORVOGEL, W., LIEJENDEKKER, R., HARDING, C.V., MELIEF, C.J., GEUZE, H.J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 1996, 183, 1161-72.
- RODRÍGUEZ, F., HARKINS, S., SLIFKA, M.K., WHITTON, J.L. Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *Journal of Virology*, 2002, 76, 4251-9.
- ROHDE, M., DAUGAARD, M., JENSEN, M.H., HELIN, K., NYLANDSTED, J., JAATTELA, M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Development*, 2005, 19, 570-82.
- RUCHALSK, K., MAO, H., LI, Z., WANG, Z., GILLERS, S., WANG, Y., MOSSER, D.D., GABAI, V., SCHWARTZ, J.H., BORKAN, S.C. Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. *Journal Biological Chemistry*, 2006, 281, 7873-80.
- SALEH, A., SRINIVASULA, S.M., BALKIR, L., ROBBINS, P.D. and ALNEMRI, E.S. Negative regulation of the apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biology*, 2000, 2, 476-83.
- SCREATON, G. and XU, X.N. T cell life and TNF receptor family members. *Current Opinion in Immunology*, 2000, 11, 277-85.
- SKOKOS, D., BOTROS, H.G., DEMEURE, C., MORIN, J., PERONET, R., BIRKENMEIER, G., BOUDALY, S., MECHERI, S. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *Journal of Immunology*, 2003, 170, 3037-45.
- SCHMITT, C.A., FRIDMAN, J.S., YANG, M., LEE, S., BARANOV, E., HOFFMAN, R.M., LOWE, S.W. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, 2002, 109, 335-46.
- SOMERSAN, S., LARSSON, M., FONTENEAU, J.F., BASU, S., SRIVASTAVA, P., BHARDWAJ, N. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *Journal of Immunology*, 2001, 167, 4844-52.
- SREEDHAR, A.M., CSERMELY, P.H. Heat shock proteins in the regulation of the apoptosis: New strategies in tumor therapy A comprehensive review. *Pharmacology and therapeutics*, 2004, 101, 227-57.
- SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., FERNANDES-ALNEMRI, T. and ALNEMRI, E.S. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1 mediated oligomerization. *Molecular Cell*, 1998, 7, 949-57.
- SRIVASTAVA, P.K. Heat shock proteins in immune response to cancer: the Fourth Paradigm. *Experientia*, 1994, 50, 1054-60.

- STANKIEWICZ, A.R., LACHAPELLE, G., FOO, C.P., RADICIONI, S.M., MOSSER, D.D. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280, 38729-39.
- SUSIN, S.A., LORENZO, H.K., ZAMZAMI, N., MARZO, I., SNOW, B.E., BROTHERS, G.M., MANGION, J., JACOTOT, E., COSTANTINI, P., LOEFFLER, M. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 1999, 397, 441-46.
- SUZUKI, Y., IMAI, Y., NAKAYAMA, H., TAKAHASHI, K., TAKIO, K. and TAKAHASHI, R. A serine protease; HtrA2; is released from the mitochondria and interacts with XIAP; inducing cell death. *Molecular Cell*, 2001, 8, 613-21.
- TAKAYAMA, S., KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., KITADA, S., ZAPATA, J.M., KOCHER, K., KNEE, D., SCUDIERO, D., TUDOR, G., MILLER, G.J., MIYASHITA, T., YAMADA, M., REED, J.C. Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Research*, 1998, 58, 3116-31.
- TAMURA, Y., TSUBOI, N., SATO, N., KIKUCHI, K. 70 kDa heat shock cognate protein is a transformation-associated antigen and a possible target for the host's anti-tumor immunity. *Journal of Immunology*, 1993, 151, 5516-24.
- THERY, C., REGNAULT, A., GARIN, J., WOLFERS, J., ZITVOGEL, L., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G., AMIGORENA, S. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *Journal Cell Biology*, 1999, 147, 599-610.
- THERY, C., DUBAN, L., SEGURA, E., VERON, P., LANTZ, O., AMIGORENA, S. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunology*, 2002, 3, 1156-62.
- THERY, C., ZITVOGEL, L., AMIGORENA, S. Exosomes: composition; biogenesis and function. *Nature Review Immunology*, 2002, 2, 569-79.
- TODRYK, S., MELCHER, A.A., HARDWICK, N., LINARDAKIS, E., BATEMAN, A., COLOMBO, M.P., STOPPACCIARO, A., VILE, R.G. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *Journal of Immunology*, 1999, 163, 1398-408.
- UDONO, H., P.K. SRIVASTAVA. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96; hsp90; and hsp70. *Journal of Immunology*, 1994, 152, 5398-403.
- VAN NIEL, G., MALLEGOL, J., BEVILACQUA, C., CANDALH, C., BRUGIERE, S., TOMASKOVIC-CROOK, E., HEATH, J.K., CERF-BENSUSSAN, N., HEYMAN, M. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut*, 2003, 52, 1690-7.
- VERHAGEN, A.M., EKERT, P.G., PAKUSCH, M., SILKE, J., CONNOLLY, L. M., REID, G.E., MORITZ, R.L., SIMPSON, R.J. and VAUX, D.L. Identification of DIABLO; a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000, 102, 43-53.

- VIEIRA, H., BOYA, P., COHEN, I., HAMEL, C., HAOUI, D., DRUILLENEC, S., BELZACQ, A., BRENNER, C., ROQUES, B. and KROEMER, G. Cell permeable BH3-peptides overcome the cytoprotective effect of Bcl-2 and Bcl-X(L). *Oncogene*, 2002, 21, 1963-77.
- WANG, L., GUO, Y., HUANG, W.J., KE, X., POYET, J.L., MANJI, G.A., MERRIAM, S., GLUCKSMANN, M.A., DISTEFANO, P.S., ALNEMRI, E.S., BERTIN, J. Card10 is a novel caspase recruitment domain/membrane-associated guanylate kinase family member that interacts with BCL10 and activates NF-kappa B. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276, 21405-9.
- WILLIS, S., DAY, C.L., HINDS, M.G., HUANG, D.C. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *Journal of Cellular Science*, 2003, 116, 4053-6.
- WOLF, B., GREEN, D.R. Suicidal tendencies; apoptotic cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274, 20049-52.
- WOLFERS, J., LOZIER, A., RAPOSO, G., REGNAULT, A., THERY, C., MASURIER, C., FLAMENT, C., POUZIEUX, S., FAURE, F., TURSZ, T., ANGEVIN, E., AMIGORENA, S., ZITVOGEL, L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine*, 2001, 7, 297-303.
- YANG, J., LIU, X., BHALLA, K., KIM, C.N., IBRADO, A.M., CAI, J., PENG, T.I., JONES, D.P. and WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2; release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 1997a, 275, 1129-32.
- YANG, X., KHOSRAVI-FAR, R., CHANG, H.R. and BALTIMORE, D. Daxx; a novel fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, 1997b, 89, 1066-76.
- ZHENG, H., LI, Z. Cutting edge: cross-presentation of cell-associated antigens to MHC class I molecule is regulated by a major transcription factor for heat shock proteins. *Journal of Immunology*, 2004, 173, 5929-33.
- ZITVOGEL, L., REGNAULT, A., LOZIER, A., WOLFERS, J., FLAMENT, C., TENZA, D., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G., AMIGORENA, S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine*, 1998, 4, 594-600.
- ZOU, H., HENZEL, W.J., LIU, X., LUTSCHG, A. and WANG, X. Apaf-1; a human protein homologous to *C. elegans* CED-4; participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 1997, 90, 405-13.
- ZOU, H., LI, Y., LIU, X. and WANG, X. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274, 11549-56.
- ZYLICZ, M., KING, F.W., WAWRZYNOW, A. Hsp70 interactions with the tumour suppressor protein; p53; *EMBO Journal*, 2001, 20, 4634-8.

Recibido: 02-02-2007

Aprobado: 30-08-2007