

# Proteínas de choque térmico en parásitos: la Hsp70 y el sistema inmune.

**Carmelo, E.; Zurita, A.I.; González, A.C.; Martínez, E.; Valladares, B.**

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias. 38204 La Laguna, Tenerife, España.

Recibido: 26.0

Aceptado: 10.12.05

**Resumen:** La respuesta fisiológica de células u organismos completos frente a los efectos perjudiciales del estrés ambiental se denomina respuesta de choque térmico. Esta respuesta es universal, observándose tanto en bacterias como en eucariotas inferiores, plantas y humanos. Se caracteriza por una rápida inducción del producto de unos genes específicos, que producen las denominadas proteínas de choque térmico. Estas proteínas están entre las moléculas más altamente conservadas que se conocen, tanto en estructura primaria, como en el modo de regulación y en sus funciones bioquímicas, y tienen un papel fundamental en muchas actividades vitales para la célula. También han sido identificadas como las principales inmunógenas en diversas enfermedades infecciosas y en síndromes de autoinmunidad. Asimismo, las Hsps, y particularmente la Hsp70, presentan una actividad inmunomoduladora que las convierten en candidatas a ser utilizadas como adyuvantes de vacunas. Las múltiples facetas que presentan las proteínas de choque térmico las convierten en una de las moléculas más interesantes en la investigación en muchas áreas de la biología celular, como el tráfico a través de membranas, el metabolismo de los ácidos nucleicos y proteínas, enfermedades crónicas degenerativas, inmunología y enfermedades infecciosas.

**Palabras clave:** Proteínas de choque térmico, Hsp70, chaperona molecular, inmunomodulación.

**Abstract:** The cellular response against stress is called heat-shock response. This is a universal response that has been observed in all kinds of organisms, such as lower eukaryotes, plants and humans. This response is characterised by the expression of a series of genes that produce the “heat-shock proteins” (Hsps). These proteins are among the most evolutionarily conserved according to their primary structure, their regulation and their biochemical functions, and also play a crucial role in numerous life-preserving processes in the cells. Besides this, Hsps have been described as immunogenic in several infectious diseases and auto-immune syndromes. Moreover, the proteins belonging to the Hsp family, and particularly Hsp70, have been shown to produce modulation in the immune response, a feature that turns them into candidates to be used as vaccine adjuvants. The multiple aspects of Heat-shock proteins cause them to be some of the most interesting molecules in cell biology research, membrane trafficking, protein and nucleic acid metabolism, degenerative diseases, immunology and infectious diseases.

**Keywords:** Heat-shock protein, Hsp70, molecular chaperone, immunomodulation.

## 1. Introducción

La respuesta fisiológica de células u organismos completos frente a los efectos perjudiciales del estrés ambiental, como incrementos bruscos de la temperatura, se denomina respuesta de choque térmico. Se caracteriza por una rápida inducción del producto de unos genes

específicos, normalmente por activación transcripcional. Esta respuesta es universal, y se ha observado tanto en bacterias, como en eucariotas inferiores, plantas y humanos. Aparte del incremento de temperatura, son muchos los estímulos estresantes que inducen una respuesta similar a nivel celular, como el etanol, metales pesados, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, inhibición del transporte de electrones, hormonas esteroideas o prostaglandinas (Lindquist, 1992).

Las proteínas de choque térmico están ampliamente distribuidas en la naturaleza, donde se han observado en las células de todos los organismos, desde procariontes a eucariotas, y están entre las moléculas más altamente conservadas que se conocen, tanto en

---

Corresponding author:

Dr. D. Basilio Valladares Hernández.

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias.

C/. Astrofísico Fco. Sánchez s/n

38204 La Laguna, Tenerife, España.

Tfno: 922 318486, Fax: 922 318514

E-mail: bvallada@ull.es

estructura primaria, como en el modo de regulación y en las funciones bioquímicas (Minowada y Welch, 1995). En las células eucarióticas se han encontrado en diferentes compartimentos celulares y organelas, como el citoplasma, mitocondria, cloroplasto y retículo endoplasmático. Las proteínas de choque térmico (Hsps) se clasifican en función de su peso molecular. La mejor estudiada y la más representativa de la familia es la Hsp70; la familia Hsp90 incluye Hsps con pesos moleculares entre 80 y 110 kDa; la Hsp60 incluye el grupo de Hsps entre 58 y 65 kDa; las Hsps de bajo peso molecular varían entre 15 y 45 kDa, y se incluyen en la familia Hsp10; por último, está la ubiquitina que es un péptido de tan solo 76 aminoácidos.

La síntesis de las proteínas de choque térmico lleva a la adquisición de tolerancia a situaciones de estrés que en otras condiciones conducirían a la apoptosis celular (Mosser *et al.*, 2000, Beere y Green, 2001), sin embargo, algunas Hsps se producen constitutivamente a nivel basal. En *E. coli*, el homólogo de la Hsp60 GroEL, representa del 1 al 2% del contenido proteico total bajo condiciones normales, mientras que su concentración se incrementa de 4 a 5 veces bajo condiciones de estrés (Shinnick, 1991). También hay proteínas próximas a las Hsps que tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero que sin embargo no son inducibles por el estrés y se producen sólo a temperaturas normales. Están codificadas por genes distintos y se denominan proteínas *cognate* (Hsc).

Todo esto ha mostrado que las Hsps tienen un papel fundamental en muchas actividades vitales para la célula aún en condiciones que no pueden considerarse de estrés. Además, se las ha encontrado en niveles anormalmente elevados en determinadas condiciones patológicas, como enfermedades neurodegenerativas (Chopp, 1993) o cáncer (Welch, 1992). También han sido identificadas como las principales inmunógenas en diversas enfermedades infecciosas y en síndromes de autoinmunidad (Young, 1992, Minowada y Welch, 1995, Oka *et al.*, 2001). Por otro lado, la actividad inmunomoduladora de las Hsps las convierten en candidatas a ser utilizadas como adyuvantes de vacunas (Rico *et al.*, 1999, Planelles *et al.*, 2001). Estos motivos apoyan el hecho de que en la actualidad las estructuras y funciones de las proteínas de choque térmico sean blanco de investigación en muchas áreas de la biología celular, como el tráfico a través de membranas, el metabolismo de los ácidos nucleicos y proteínas, enfermedades crónicas degenerativas, inmunología y enfermedades infecciosas.

## 2. Funciones de las proteínas de choque térmico.

Las proteínas de choque térmico llevan a cabo múltiples funciones importantes tanto bajo condiciones de estrés como de no-estrés. Por ejemplo, en el plegamiento y translocación de proteínas recién sintetizadas, regulación

del grado de glicosilación, activación de proteínas reguladoras específicas como factores de transcripción o kinasas, degradación proteica, señalización proteica, activación de hormonas esteroideas, inmunogenicidad tumoral o presentación antigénica (Helmbrecht *et al.*, 2000). Debido a este amplio espectro de funciones colaboradoras, las Hsps también han sido denominadas “chaperonas moleculares”. Sin embargo, no todas las Hsps son chaperonas moleculares, ni todas las chaperonas son Hsps (Ellis y Hartl, 1999).

Las Hsps previenen la desnaturalización de proteínas en células de mamífero y bacterianas, estabilizando proteínas mal o parcialmente plegadas y promoviendo la generación de la estructura terciaria correcta (Becker y Craig, 1994, Hartl, 1996). La Hsp70 mitocondrial (en levaduras Ssc) promueve tanto la translocación de los polipéptidos como su re-naturalización en la matriz mitocondrial (Hartl *et al.*, 1994). En *E. coli*, el homólogo de la Hsp70, DnaK, estabiliza las proteínas recién sintetizadas y promueve la formación de complejos proteicos multiméricos así como su desensamblaje. En eucariotas, una Hsp70 (Hsc73) participa en la degradación lisosomal de las proteínas citosólicas y en la eliminación de la clatrina de las vesículas cubiertas (Welch, 1992).

En el retículo endoplasmático, BiP, también conocida como grp78, tiene un amplio papel en el ensamblaje de proteínas importadas. Une intermediarios de complejos polipeptídicos multiméricos y controla su ensamble adecuado. Se ha demostrado su implicación directa en la formación de complejos multiméricos de muchas proteínas, incluyendo inmunoglobulinas, receptores de linfocitos T, y moléculas del MHC (DeNagel y Pierce, 1992, Melnick y Argon, 1995). Además de BiP, un miembro de la familia Hsp90, gp96 ó grp94, participa en el ensamblaje de las moléculas de anticuerpo. Después de ser transportadas al lumen del retículo endoplasmático, las cadenas pesadas y ligeras de las moléculas de inmunoglobulina se unen secuencialmente a la Hsp70 y a la gp96 (Melnick *et al.*, 1994). Srivastava y colaboradores (1994) han mostrado que el transporte de péptidos desde el proteasoma hacia el retículo endoplasmático y la posterior carga del péptido al MHC tipo I, depende de una batería de Hsps incluyendo miembros de las familias de las Hsp70 y Hsp90. Esto muestra que las Hsps están involucradas tanto en el procesamiento como en la presentación de antígenos (Williams y Watts, 1995).

## 3. Respuesta de choque térmico en parásitos

La respuesta de choque térmico juega un papel fundamental en los parásitos durante la invasión al hospedador, donde el aumento en la producción de Hsps se correlaciona con un incremento en la infectividad y patogenicidad. Se han encontrado Hsps de parásitos

en el curso de varias infecciones parasitarias, como las producidas por *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Giardia*, *Schistosoma*, y por hongos patógenos, como *Candida* o *Histoplasma*. Durante la invasión, los parásitos experimentan un cambio de temperatura desde los 22-28°C de los vectores hasta los 37°C del hospedador mamífero. No sólo deben adaptarse al aumento de temperatura sino también a las diferentes condiciones del medio, como son el potencial redox y la presencia o ausencia de nutrientes y hormonas. El parásito también se enfrenta a mecanismos de resistencia natural como la fagocitosis, y dentro del fagocito a los productos oxidativos y las enzimas lisosomales. Puesto que los parásitos sufren un repentino y drástico cambio de la temperatura ambiental tras la infección, donde no hay tiempo de desarrollar la termotolerancia, probablemente ésta no sea la respuesta de choque térmico más relevante. Todo el aparato celular, incluyendo la maquinaria de maduración de los ARNm y las estructuras de membrana, deben permanecer funcionales para permitir la supervivencia del parásito y que tengan lugar los cambios morfológicos que suelen acompañar a la entrada en el hospedador mamífero (Shapira *et al.*, 1988). Esto podría llevarse a cabo por la evolución de estructuras termo-resistentes, o bien, por la existencia de un estado constitutivo de termotolerancia previo a la infección (Maresca y Carratu, 1992). La expresión constitutiva de las Hsps, pre-adapta al parásito a las condiciones del hospedador mamífero, pero durante la respuesta de choque térmico, el parásito induce rápidamente los genes *HSPs*, incrementando la síntesis de las Hsps e inhibiendo la de la mayoría de las proteínas. En tripanosomátidos estos genes están implicados en la diferenciación de promastigotes a amastigotes (Van der Ploeg *et al.*, 1985). La Hsp70 es una de las Hsps que participa en la protección de los eventos de *splicing* de los precursores policistrónicos de ARNm, así como en la prevención de la desnaturalización proteica debida a las altas temperaturas. Se ha mostrado que a altas temperaturas la Hsp70 migra al núcleo donde se asocia con polipéptidos parcialmente desnaturalizados y que se han agregado formando complejos insolubles, para promover su disgregación (Pelham, 1990).

#### 4. Antigenicidad de las proteínas de choque térmico en parásitos

Las Hsps, generalmente la Hsp70, están entre los antígenos inmunodominantes reconocidos por el sistema inmune en un amplio espectro de parasitosis (Young *et al.*, 1990). Aparte de su implicación en las interacciones parásito-hospedador, también asumen una importancia inmunológica, aún cuando las Hsps están entre las proteínas más conservadas evolutivamente, con índices de identidad en todos los casos superiores

al 50%. Por esta razón, las proteínas de choque térmico de *Leishmania* han sido denominadas “panantígenos”. Son proteínas muy conservadas, que se encuentran en la célula como multímeros proteicos, con un alto porcentaje de reconocimiento por sueros de pacientes con leishmaniosis y que han sido descritas como antígenos durante otros procesos infecciosos y enfermedades autoinmunes (Requena *et al.*, 2000). Durante la infección con *Leishmania*, muchas células infectadas son destruidas, liberando estos panantígenos que son entonces fagocitados y procesados por células presentadoras de antígenos profesionales (APCs). La fuerte respuesta inmune tanto celular como humoral frente a las Hsps que se observa en humanos y animales con leishmaniosis puede deberse a su alta abundancia en los parásitos, especialmente bajo condiciones de estrés, a su estabilidad, a su capacidad de ser procesadas por APCs, y a la memoria inmunológica que genera la frecuente re-estimulación con los determinantes antigénicos conservados de las Hsps de otros patógenos. Así, se ha sugerido que la ubicua distribución de las Hsps y su conservación de secuencia ha sido aprovechada por el sistema inmune para desarrollar una respuesta universal y rápida contra la infección (Kaufmann y Schoel, 1994).

La Hsp70 es altamente reconocida por el sistema inmune en muchas infecciones parasitarias, como la leishmaniosis (MacFarlane *et al.*, 1990, Quijada *et al.*, 1996a,b, Amorim *et al.*, 1996), tripanosomiosis (Engman *et al.*, 1990, Krautz *et al.*, 1998), malaria (Ardehshir *et al.*, 1987), esquistosomosis (Hedstrom *et al.*, 1987), o filariosis (Rothstein *et al.*, 1989, Selkirk *et al.*, 1989). Los miembros de la familia Hsp83/90 también han sido descritos como antígenos inmunodominantes durante las infecciones causadas por *L. donovani* (De Andrade *et al.*, 1992), *L. infantum* (Angel *et al.*, 1996) y *L. braziliensis* (Skeiky *et al.*, 1995). En la candidiosis se ha descrito un antígeno inmunodominante de 47 kDa, procedente de la proteólisis de la Hsp90 de *Candida albicans* (Matthews y Bourne, 1992). En pacientes tuberculosos se han encontrado fuertes reactividades humorales y celulares frente a las proteínas Hsp60, Hsp65 y Hsp70 de *Mycobacterium tuberculosis* (Havlir *et al.*, 1991). La Hsp60 de *L. major* también se ha descrito como un antígeno inmunodominante (Rey-Ladino *et al.*, 1997).

Por otra parte, varios estudios han implicado a las Hsps en diversas enfermedades autoinmunes y condiciones patológicas, como enfermedades crónicas inflamatorias, neuro-degenerativas o cáncer, en las que se han encontrado niveles elevados de auto-anticuerpos o de Hsps (Zügel y Kaufmann, 1999).

#### 5. Proteínas de choque térmico de 70 kDa: Hsp70

Entre las Hsps, los miembros de la familia de las Hsp70 son los de mayor importancia como “chaperonas

moleculares<sup>37</sup>. Se identificaron por primera vez en células de *Drosophila* sometidas a un rápido incremento de temperatura (Tissières *et al.*, 1974). Los genes que codifican las Hsp70 muestran una expresión tanto constitutiva como inducible. Al igual que en levaduras y mamíferos, en tripanosomátidos también se ha identificado la proteína Hsp70 citosólica (cy-Hsp70), que se distribuye por todo el citoplasma, la mitocondrial (mt-Hsp70) y la del retículo endoplasmático (grp78), donde facilitan la translocación de las proteínas a dichas organelas. La mt-Hsp70 está concentrada en el kinetoplasto, donde puede tener algún papel en el metabolismo de los ácidos nucleicos de los tripanosomátidos (Engman *et al.*, 1992).

Los miembros de la familia de las Hsp70 son los más conservados evolutivamente, tanto en estructura como en función. DnaK, la única Hsp70 de *E. coli*, tiene aproximadamente un 50% de identidad de secuencia con las Hsps de eucariotas (Georgopoulou *et al.*, 1990), las cuales están codificadas por múltiples genes *HSP70* que muestran entre un 50 y 95% de identidad a nivel de nucleótidos. Algunas Hsp70 contienen extensiones cortas amino o carboxi-terminales requeridas para la entrada o la retención en el compartimento celular apropiado. BiP contiene una secuencia señal hidrofóbica específica para su importe al retículo endoplasmático y un tetrapéptido carboxi-terminal (KDEL en mamíferos, o HDEL en levaduras) responsable de la retención de la proteína en el lumen del retículo. Así mismo, las Hsp70 localizadas en la mitocondria, como la mtHsp70 de *Leishmania major* (Searle *et al.*, 1993) o de *Trypanosoma cruzi* (Engman *et al.*, 1989) contienen extensiones hidrofílicas amino-terminales requeridas para su importe a dicha organela.

Las Hsp70 constan de dos dominios: un dominio amino-terminal de 44 kDa (residuos 1-384) que une e hidroliza ATP, y un dominio carboxi-terminal, de aproximadamente 30 kDa, que contiene el sitio de unión al péptido. La comparación de todas las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia de las Hsp70 muestra que los dos tercios amino-terminales de estas proteínas están mucho más conservados que la región carboxi-terminal, lo que sugiere un dominio ATPasa conservado seguido de una región de unión al péptido variable. La estructura tridimensional muestra que el dominio ATPasa consiste en dos lóbulos donde la unión del nucleótido de adenina se produce en la base que queda entre ambos (Flaherty *et al.*, 1990). El dominio carboxi-terminal une péptidos a través de residuos hidrofóbicos de un modo poco específico, al contrario que los sitios de unión específicos de las enzimas. BiP tiene un único sitio de unión a péptidos que recuerda al bolsillo de unión al péptido del MHC tipo I, y reconoce preferencialmente péptidos de 7 a 8 aminoácidos (Roman *et al.*, 1994).

Las Hsp70 interactúan a través de su dominio carboxi-terminal con dominios no-nativos expuestos

durante la traducción proteica, la translocación a través de membrana, la oligomerización, o la degradación. Determinadas condiciones pueden alterar la estructura proteica, haciendo que se expongan regiones hidrofóbicas que normalmente están en el interior de la molécula y llevando a su agregación y pérdida de función. La capacidad de la Hsp70 de unirse a estas regiones hidrofóbicas viene dada por un mecanismo ATPasa de relajación que previene la agregación proteica y ayuda en el establecimiento de la conformación nativa (Hartl, 1996). Sin embargo, las alteraciones de secuencia, como la sustitución, delección o inserción de aminoácidos, modificaciones post-traduccionales aberrantes, como una glicosilación incorrecta, o condiciones de estrés ambiental, no permiten un correcto plegamiento, y las Hsp70 actuarían llevando a estas estructuras a las vías de degradación lisosomal.

El sitio de unión al péptido se localiza en una región de 15 kDa próxima al extremo carboxi-terminal. Su unión y liberación están reguladas por la unión del ATP y su hidrólisis, que ocurre en el dominio ATPasa. La hidrólisis del ATP promueve un cambio conformacional en la Hsp70 que es transmitido al péptido unido. El *turnover* del ATP está regulado por una familia de cochaperonas que se unen tanto al dominio ATPasa como a la región de 10 kDa carboxi-terminal (Brehmer *et al.*, 2001).

## 6. Utilidad diagnóstica y propiedades inmuno-moduladoras de la Hsp70.

Como ya se ha mencionado, la Hsp70 es un antígeno dominante en un amplio espectro de infecciones parasitarias, lo que es sorprendente teniendo en cuenta que es una de las proteínas más conservadas que se conocen. Se han encontrado niveles altos de anticuerpos anti-Hsp70 en el suero de personas y animales con diferentes formas clínicas de leishmaniosis. A pesar de la alta identidad de secuencia entre las Hsp70 del hospedador y de *Leishmania*, la respuesta del sistema inmune se dirige específicamente contra la Hsp70 del parásito (Maresca y Carratu, 1992, Skeiky *et al.*, 1995, Quijada *et al.*, 1996b) y no se inducen autoanticuerpos durante la infección (Skeiky *et al.*, 1995).

El hecho de que la Hsp70 sea una proteína abundante, que induce una fuerte respuesta humoral y celular específica durante la infección, ha llevado a su estudio como herramienta para el diagnóstico inmunológico. Hay diversos trabajos donde se ha estudiado la antigenicidad de las Hsp70 de tripanosomátidos, como la de *L. donovani* (MacFarlane *et al.*, 1990, De Andrade *et al.*, 1992, Wallace *et al.*, 1992, Arora *et al.*, 1995), *T. cruzi* (Yeyati *et al.*, 1991, Requena *et al.*, 1993, Krautz *et al.*, 1998), *L. infantum* (Quijada *et al.*, 1996a b, Quijada *et al.*, 1998) o *L. braziliensis* (Amorim *et al.*, 1996, Zurita *et al.*,

2003). Los resultados obtenidos han sido diferentes; así, se ha propuesto que la Hsp70 de *L. donovani* es específica de enfermedad, es decir, sólo es reconocida por sueros de pacientes con LV, no mostrando reacción cruzada con sueros de pacientes con otras parasitosis (MacFarlane *et al.*, 1990, De Andrade *et al.*, 1992, Wallace *et al.*, 1992). En cambio, ni la Hsp70 de *T. cruzi* (Requena *et al.*, 1993, Krautz *et al.*, 1998) ni la de *L. infantum* (Quijada *et al.*, 1996a, Quijada *et al.*, 1998) mostraron un reconocimiento específico de enfermedad, por lo que ha sido necesaria la búsqueda de determinantes antigénicos específicos, útiles para ser empleados en el diagnóstico inmunológico. Con respecto a la Hsp70 de *L. braziliensis*, Amorim *et al.* (1996) estudiaron la antigenicidad de dos subfragmentos de la proteína, sin obtener buenos resultados respecto a la especificidad. Por otra parte, Zurita *et al.* en 2003 purificaron un fragmento de 150 aminoácidos de la Hsp70 de *L. braziliensis* que produjo excelentes resultados en cuanto a la especificidad en el diagnóstico serológico de la leishmaniosis cutánea y mucocutánea, no presentando reacciones cruzadas con enfermos chagásicos o sueros de individuos no infectados por el parásito.

Aparte del interés que la Hsp70 suscita en cuanto a su posible utilización como herramienta de diagnóstico, en estos años se ha sugerido que las Hsps juegan un papel crítico en la producción de una respuesta inmune específica frente a cánceres y agentes infecciosos, donde la especificidad es debida a los péptidos antigénicos complejados con las Hsps (Schild *et al.*, 1999). Se ha sugerido que la distribución ubicua de estas proteínas y su elevada conservación de secuencia, ha sido explotada por el sistema inmune para desarrollar una respuesta rápida y universal contra las infecciones (Kaufmann, 1990). De este modo, las Hsps actuarían como chaperonas, no sólo durante la biogénesis de otras proteínas, sino también durante la respuesta inmune a otros antígenos.

Estas propiedades inmunoestimuladoras convierten a las Hsp70 en *carriers* o adyuvantes en vacunas conjugadas, debido a su alta afinidad de unión a determinados péptidos y su implicación en varios pasos del procesamiento antigénico. No hay un adyuvante inmune potente que haya sido aprobado para el uso humano de forma general y, en este punto, las proteínas Hsps serían candidatas a ser adyuvantes induciendo una respuesta celular T sin problemas de tolerancia.

La Hsp70 potencia una fuerte respuesta inmune celular T-CD8<sup>+</sup> contra los péptidos antigénicos unidos. La eficiencia de este proceso es debida a que los complejos Hsp70-antígeno entran en las células presentadoras de antígeno por una endocitosis mediada por receptor, donde éste ha sido identificado recientemente como CD91 (Basu *et al.*, 2001). A continuación, los péptidos antigénicos son transportados desde el citoplasma hasta el retículo endoplasmático por un sistema de transporte

especializado, denominado transportador asociado con el procesamiento antigénico (TAP). En el retículo endoplasmático, gp96 actúa como aceptor del péptido. Posteriormente, los complejos gp96-péptido se unen al MHC, donde, por un mecanismo dependiente de ATP, los péptidos son translocados desde gp96 al MHC de clase I, donde son presentados y posteriormente reconocidos por los linfocitos T-CD8<sup>+</sup>. Se ha encontrado que en células de ratón deficientes en TAP, la Hsp70 también presenta los péptidos de una forma eficaz a través del MHC tipo I, por que la presentación del antígeno también puede ocurrir por una ruta distinta a la clásica (Schirmbeck *et al.*, 1997). La conservación de las funciones de la Hsp70 y gp96 en el procesamiento antigénico, sugiere la importancia de las Hsps en la evolución del sistema inmune vertebrado (Roberts *et al.*, 2001).

Trabajos recientes han mostrado que las Hsps de varios patógenos poseen propiedades moduladoras cuando son utilizados como adyuvantes en las inmunizaciones. Así, Suzue y Young (1996) obtuvieron que la inmunización con la proteína recombinante p24 del VIH fusionada a la proteína Hsp70 de *M. tuberculosis* potencia una respuesta inmune tanto humoral como celular contra p24 en ausencia de adyuvante. La unión de la Hsp70 de *M. tuberculosis* al antígeno E7 del papilomavirus humano tipo 16 (HPV-16), genera una respuesta inmune específica para E7 mediada por células T mucho más elevada (Hsu *et al.*, 2001). En pacientes con cáncer se ha encontrado que la respuesta frente a la proteína p53 mutada es dependiente de la asociación con la Hsp70, de tal forma que los tumores que expresan p53 mutada, pero no en asociación con la Hsp70, no son capaces de inducir la producción de anticuerpos frente a p53 (Davidoff *et al.*, 1992). Además, se han identificado los motivos asociados a la unión a las Hsps para ser utilizados en la construcción de péptidos híbridos. Moroi *et al.* (2000) no han empleado la proteína Hsp para realizar la construcción recombinante, sino sólo péptidos que contienen dominios con alta afinidad de unión a las proteínas Hsps, potenciándose una respuesta citotóxica T-CD8<sup>+</sup>.

También se han estudiado las propiedades inmunomoduladoras de las Hsp70 de tripanosomátidos. Un estudio realizado con la Hsp70 de *L. infantum* muestra que las propiedades inmuno-estimuladoras se localizan en el dominio amino-terminal, donde se produce la unión e hidrólisis del ATP, que potencia principalmente una respuesta tipo Th1 (Rico *et al.*, 1999). Planelles *et al.* (2001) han desarrollado una vacuna genética donde han fusionado el gen *HSP70* de *T. cruzi* al del antígeno de interés, KMP11. La inmunización de ratones con el plásmido de fusión provocó un descenso en la parasitemia y confirió protección frente a la infección experimental con *T. cruzi*. Potenció una respuesta inmune humoral IgG 2a de larga duración contra la proteína KMP11

y la activación de los linfocitos T-CD8<sup>+</sup> citotóxicos específicos de dos péptidos del antígeno, lo que llevó a la protección celular. Asimismo, Marañón *et al.* (2001) han descrito cómo la inmunización de ratones transgénicos A2/K<sup>b</sup> con Hsp70 fusionada covalentemente a la KMP11 de *T. cruzi* es capaz de inducir una respuesta CTL contra células humanas que expresan la KMP11 de *T. cruzi* lo que es un resultado alentador en la búsqueda de una molécula inductora de una respuesta citotóxica protectora frente a la infección por *T. cruzi*. Planelles *et al.* (2002) presentaron resultados que demostraban que la Hsp70 de *T. cruzi*, tanto sola como fusionada a la KMP11 induce la maduración de células dendríticas de ratón, estimulando la producción de IL-12, TNF- $\alpha$  y marcadores como CD25, CD40, CD80, CD86 e ICAM. Otra evidencia de la interesante capacidad inmunomoduladora de la Hsp70 es la actividad de la proteína de fusión Hsp70 de *T. cruzi* - L14 de *L. braziliensis* (González *et al.* 2004). La proteína ribosomal L14 de *L. braziliensis* no es inmunogénica en enfermos de leishmaniosis cutánea o en ratones inoculados con la misma. Sin embargo, la inoculación de ratones con la fusión Hsp70-L14 induce una fuerte respuesta inmunológica específica contra la L14 en ratones, caracterizada por un elevado título de anticuerpos, particularmente del subtipo IgG<sub>2a</sub>, indicativo de la inducción de una respuesta del tipo Th1. Asimismo, esplenocitos de ratón inmunizados con la fusión Hsp70-L14 muestran un elevado índice de proliferación comparado con los inmunizados con la L14 sola.

La capacidad inmunomoduladora de la Hsp70 se relaciona en la literatura con su capacidad de interactuar con las células presentadoras de antígenos (Singh-Jasuja *et al.* 2001). Esta modulación se basa en la capacidad de las Hsp para unirse a péptidos antigénicos, la existencia de receptores en la superficie de las células presentadoras de antígenos que permiten la rápida introducción de los complejos Hsp-péptido desde el fluido extracelular, y finalmente la capacidad de las Hsp de activar las células presentadoras de antígeno, estimulándolas a producir una respuesta T-citotóxica contra los péptidos asociados a ellas. Estos factores hacen de la Hsp70 una molécula muy prometedora para la generación de respuestas protectoras frente a la enfermedad, la inmunoterapia, e incluso su combinación con la quimioterapia convencional.

## 7. Referencias

- Amorim, A. G.; Carrington, M.; Miles, M. A.; Barker, D. C. and Cardoso de Almeida, M. L. 1996. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. *Cell Stress Chaperones*, 1, 177-187.
- Angel, S. O.; Requena, J. M.; Soto, M.; Criado, D. and Alonso, C. 1996. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Trop*, 62, 45-56.
- Ardeshir, F.; Flint, J. E.; Richman, S. J. and Reese, R. T. 1987. A 75 kd merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum* which is related to the 70 kd heat-shock proteins. *EMBO J*, 6, 493-499.
- Arora, S. K.; Melby, P. C. and Sehgal, S. 1995. Lack of serological specificity of recombinant heat shock protein of *Leishmania donovani*. *Immunol. Cell Biol*, 73, 446-451.
- Basu, S.; Binder, R. J.; Ramalingam, T. and Srivastava, P. K. 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70 and calreticulin. *Immunity*, 14, 303-313.
- Becker, J. and Craig, E. A. 1994. Heat shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem*, 219, 11-23.
- Beere, H. M. and Green, D. R. 2001. Stress management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 11, 6-10.
- Brehmer, D.; Rudiger, S.; Gassler, C. S.; Klostermeier, D.; Packschies, L.; Reinstein, J.; Mayer, B. and Bukau, B. 2001. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol*, 8, 427-432.
- Chopp, M. 1993. The roles of heat shock proteins and immediate early genes in central nervous system normal function and pathology. *Curr Opin Neurol Neurosurg*, 6, 6-10.
- Davidoff, A. M.; Iglehart, J. D. and Marks, J. R. 1992. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 89, 3439-3442.
- De Andrade, C. R.; Kirchoff, L. V.; Donelson, J. E. and Otsu, K. 1992. Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *J Clin Microbiol*, 30, 330-335.
- DeNagel, D. C. and Pierce, S. K. 1992. A case of chaperones in antigen processing. *Immunol Today*, 13, 86-89.
- Ellis, R. J. and Hartl, F. U. 1999. Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol*, 9, 102-110.
- Engman, D. M.; Dragon, E. A. and Donelson, J. E. 1990. Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 144, 3987-3991.
- Engman, D. M.; Fehr, S. C. and Donelson, J. E. 1992. Specific functional domains of mitochondrial hsp70s suggested by sequence comparison of the trypanosome and yeast proteins. *Mol Biochem Parasitol*, 51, 153-155.
- Engman, D. M.; Kirchoff, L. V. and Donelson, J. E. 1989. Molecular cloning of mt70, a mitochondrial member of the hsp70 family. *Mol Cell Biol*, 9, 5163-5168.
- Flaherty, K. M.; DeLuca-Flaherty, C. and McKay, D. B. 1990. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70k heat-shock cognate protein. *Nature*, 346, 623-628.
- Georgopoulos, C.; Liberek, D. and Zylicz, M. 1990. Properties of the *Escherichia coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage lambda grow. In: *Stress proteins in Biology and Medicine* (Eds. R. I. Morimoto, A. Tissières,

- y C. Georgopoulos). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y. USA., 191-221.
- González, A.C.; Thomas, M.C.; Martínez-Carretero, E.; Carmelo, E.; López, M.C. and Valladares, B. 2004. Molecular and immunological characterization of L14 ribosomal protein from *Leishmania braziliensis*. *Parasitology*, 128,139-47.
- Hartl, F. U.; Hlodan, R. and Langer, T. 1994. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem Sci*, 19, 21-25.
- Hartl, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571- 580.
- Havlir, D. V.; Wallis, R. S.; Bomm, W. H.; Daniel, T. M.; Chervenak, K. and Ellner, J. 1991. Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect Immun*, 59, 665-670.
- Hedstrom, R.; Culpepper, J.; Harrison, R. A.; Agabian, N. and Newport, G. 1987. A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat-shock protein hsp70. *J Exp Med*, 165, 1430-1435.
- Helmbrecht, K.; Zeise, E. and Rensing, L. 2000. Chaperone in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif*, 33, 341-365.
- Hsu, K. F.; Hung, C. F.; Cheng, W. F.; He, L.; Slater, L. A.; Ling, M. and Wu, T. C. 2001. Enhancement of suicidal DNA vaccine potency by linking *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 to an antigen. *Gene Ther*, 8, 376-383.
- Kaufmann, S. H. E. 1990. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today*, 11, 129-136.
- Kaufmann, S. H. E. and Schoel, B. 1994. Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. In: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. (Eds. R. I. Morimoto, A. Tissières y C. Georgopoulos). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. N. Y. USA., 495-531.
- Krautz, G. M.; Peterson, J. D.; Godsel, L. M.; Krettli, A. U. and Engman, D. M. 1998. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat shock proteins. *Am J Trop Med Hyg*, 58, 137-143.
- Lindquist, S. 1992. Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganism. *Curr Opin Genet Dev*, 2, 755-784.
- MacFarlane, J.; Blaxter, M. L.; Bishop, R. P.; Miles, M. A. and Kelly, J. M. 1990. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70- kDa heat-shock protein family. *Eur J Biochem*, 190, 377-384.
- Marañón, C.; Thomas, M.C.; Planelles, L. and López, M.C. 2001. The immunization of A2/K(b) transgenic mice with the KMP11-HSP70 fusion protein induces CTL response against human cells expressing the T. cruzi KMP11 antigen: identification of A2-restricted epitopes. *Mol Immunol*, 38, 279-87.
- Maresca, B. and Carratu, L. 1992. The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol Today*, 8, 260-266.
- Matthews, R. C. and Bourne, J. 1992. The role of hsp90 in fungal infection. *Immunol Today*, 13, 345-348.
- Melnick, J. and Argon, Y. 1995. Molecular chaperones and the biosynthesis of antigen receptors. *Immunol Today*, 16, 243-250.
- Melnick, J.; Dul, J. L. and Argon, Y. 1994. Sequential interaction of chaperonin Bip and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature*, 370, 373-375.
- Minowada, G. and Welch, W. J. 1995. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest*, 95, 3-12.
- Moroi, Y.; Mayhew, M.; Trcka, J.; Hoe, M. H.; Takechi, Y.; Hartl, F. U.; Rothman, J. E. and Houghton, A. N. 2000. Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 97, 3485-3490.
- Mosser, D. D.; Caron, A. W.; Bourget, L.; Meriin, A. B.; Sherman, M. Y.; Morimoto, R. I. and Massie, B. 2000. The chaperone function of Hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 20, 7146-7159.
- Oka, M.; Sato, S.; Soda, H.; Fukuda, M.; Kawabata, S.; Nakatomi, K.; Shiozawa, K.; Nakamura, Y.; Ohtsuka, K. and Kohno, S. 2001. Autoantibody to heat shock protein hsp40 in sera of lung cancer patients. *Jpn J Cancer Res*, 92, 316-320.
- Pelham, H. R. B. 1990. In: *Stress Proteins in Biology and Medicine* (Eds. R. I. Morimoto, A. Tissières y C. Georgopoulos). Cold Spring Harbor, New York. USA., 287-299.
- Planelles, L.; Thomas, M. C.; Alonso, C. and López, M. C. 2001. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP-11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect Immun*, 69, 6558-6563.
- Planelles, L.; Thomas, M.; Pulgar, M.; Marañón, C.; Grabbe, S. and López, M.C. 2002. *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70 kDa, alone or fused to the parasite KMP11 antigen, induces functional maturation of murine dendritic cells. *Immunol Cell Biol*, 80, 241-7.
- Quijada, L.; Requena, J. M.; Soto, M.; Gómez, L. C.; Guzman, F.; Patarroyo, M. E. and Alonso, C. 1996a. Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* Hsp70 recognized by leishmaniasis sera. *Immunol Lett*, 52, 73-79.
- Quijada, L.; Requena, J. M.; Soto, M. and Alonso, C. 1996b. During canine viscerocutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitology*, 112, 277-284.
- Quijada, L.; Requena, J. M.; Soto, M. and Alonso, C. 1998. Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* Hsp70: design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. *Immunol Lett*, 63, 169-174.
- Requena, J. M.; Soto, M.; Guzman, F.; Maekelt, A.; Noya, O.; Patarroyo, M. E. and Alonso, C. 1993. Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* Hsp70 in chagasic and healthy individuals. *Mol Immunol*, 30, 1115-1121.
- Requena, J. M.; Alonso, C. and Soto, M. 2000. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today*, 16, 246-250.
- Rey-Ladino, J. A.; Joshi, P. B.; Sing, B.; Gupta, R. and Reiner, N. E. 1997. *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxi terminal peptide sequences. *Exp Parasitol*, 85, 249-263.

- Rico, A. I.; Angel, S. O.; Alonso, C. and Requena, J. M. 1999. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. *Mol Immunol*, 36, 1131-1139.
- Roberts, J.; Menoret, A.; Basu, S.; Cohen, N. and Srivastava; P. R. 2001. Phylogenetic conservation of the molecular and immunological properties of the chaperones gp96 and hsp70. *Eur J Immunol*, 31, 186-195.
- Roman, E.; Moreno, C. and Young; D. 1994. Mapping of Hsp70-binding sites on proteins antigens. *Eur J Biochem*, 222, 65-73.
- Rothstein, N. M.; Higashi, G.; Yates, J. and Rajan, T. V. 1989. *Onchocerca volvulus* heat shock protein 70 is a major immunogen in microfilaremic individuals from a filariasis-endemic area. *Mol Biochem Parasitol*, 33, 229-236.
- Schild, H.; Arnold-Schild, D.; Lammert, E. and Rammensee, H. G. 1999. Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Curr Op Immunol*, 11, 109-113.
- Schirmbeck, R.; Böhm, W. and Reimann, J. 1997. Stress protein (hsp73)-mediated, TAP-independent processing of endogenous, truncated SV 40 large T antigen for Dbrestricted peptide presentation. *Eur J Immunol*, 27, 2016-2023.
- Searle, S.; McCrossan, M. V. and Smith, D. 1993. Expression of a mitochondrial stress protein in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J Cell Sci*, 104, 1091-1100.
- Selkirk, M. E.; Denham, D. A.; Paterno, F. and Maizels, R. M. 1989. Heat shock cognate 70 is a prominent immunogen in Brugian filariasis. *J Immunol*, 143, 299-308.
- Shapira, M.; McEwen, J. G. and Jaffe, C. L. 1988. Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J*, 7, 2895-2901.
- Shinnick, T. M. 1991. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol*, 167, 145-160.
- Singh-Jasuja, H.; Hilf, N.; Arnold-Schild, D. and Schild, H. 2001. The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. *Biol Chem* 382,629-36.
- Skeiky, Y. A. W.; Benson, D. R.; Guderian, J. A.; Whittle, J. A.; Bacelar, O.; Carvalho, E. M. and Reed, S. G. 1995. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infect Immun*, 63, 4105-4114.
- Srivastava, P. K.; Udono, H.; Blachere, N. E. and Li, Z. 1994. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics*, 39, 93-98.
- Suzue, K. and Young, R. A. 1996. Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24. *J Immunol*, 156, 873-879.
- Tissières, A.; Mitchell, H. T. and Tracy, U. M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, 84, 389-398.
- Van der Ploeg, L. H. T.; Gianni, S. H. and Cantor, C. R. 1985. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science*, 228, 1443-1446.
- Wallace, G. R.; Ball, A. E.; MacFarlane, J.; el Safi, S. H.; Miles, M. A. and Kelly, J. M. 1992. Mapping of a visceral leishmaniasis-specific immunodominant B-cell epitope of *Leishmania donovani* Hsp70. *Infect Immun*, 60, 2688-2693.
- Welch, W. J. 1992. Mammalian cell stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev*, 7, 1063-1081.
- Williams, D. B. and Watts, T. H. 1995. Molecular chaperones in antigen processing. *Curr Opin Immunol*, 7, 77-84.
- Yeyati, P. L.; Bonnefoy, S.; Mirkin, G. Debrabant; S. L.; Panebra, A.; González- Cappa, E.; Dedet, J. P.; Hontebeyrie-Joskowicz, M. and Levin, M. J. 1991. The 70- kDa heat-shock protein is a major antigenic determinant in human *Trypanosoma cruzi/Leishmania braziliensis braziliensis* mixed infection. *Immunol Lett*, 31, 27-34.
- Young, D. B. 1992. Heat-shock proteins: immunity and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 4, 396-400.
- Young, D. B.; Mehlert, A. y Smith, D. F. 1990. Stress proteins and infectious diseases. In: *Stress Proteins and Medicine*. Eds. R.I. Morimoto, A. Tissieres & C. Georgopoulos. C.S.H. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 131-165.
- Zügel, U. and Kaufmann, S. H. E. 1999. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 12, 19-39.
- Zurita, A.I.; Rodríguez, J.; Piñero, J.E.; Pacheco, R.; Carmelo, E.; del Castillo, A. and Valladares, B. 2003. Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70 (513-663). *J Parasitol*, 89, 372-378.